

Hochschule Mittweida
University of Applied Sciences
Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

Diplomarbeit

**Produktion und Charakterisierung des transmembranen
Hüllproteins gp41 von HIV-1 als Basis für einen Impfstoff**

Vorgelegt von
Tina Hänsel
Mat.-Nr.: 17219

Betreut von
Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus
Dr. rer. nat. Joachim Denner

Mittweida, 2010

Hochschule Mittweida
University of Applied Sciences
Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

Diplomarbeit

**Produktion und Charakterisierung des transmembranen
Hüllproteins gp41 von HIV-1 als Basis für einen Impfstoff**

Vorgelegt von
Tina Hänsel
Mat.-Nr.: 17219

Mittweida, 2010

Erstprüfer: Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus
Zweitprüfer: Dr. rer. nat. Joachim Denner

Diese Arbeit wurde verteidigt am: 17.01.2011

Mission accomplished.

Bibliographische Beschreibung

HÄNSEL, TINA:

Produktion und Charakterisierung des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 als Basis für einen Impfstoff. Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Hochschule Mittweida, Mittweida. Diplomarbeit, 108 Seiten, 33 Abbildungen, 3 Tabellen, 2010.

Referat

Ziel der Diplomarbeit ist es, das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 als Antigen für Immunisierungen herzustellen. Hierzu wird die Etablierung einer permanent gp41 exprimierenden Zelllinie in humanen Zellen angestrebt, die es ermöglicht das Antigen in großen Mengen zu produzieren und erstmals in den Überstand sezerniertes Protein nachzuweisen. Neben der Charakterisierung des Antigens durch die Analyse im Western Blot wird im Epitopmapping und Neutralisationstest das Vorhandensein bindender und neutralisierender Antikörper untersucht. Um breit neutralisierende Antikörper zu gewinnen, wurden hier Immunisierungsstudien mit rekombinantem gp41 durchgeführt. Für die Etablierung einer Zelllinie wurden humane 293T-Zellen mit vier verschiedenen Expressionsvektoren transfiziert, die die Expression von rgp41 und die Selektion Geneticin-resistenter Zellen erlaubte. Zur Expressionsoptimierung wurden die Zelllinien in FKS-freiem Medium kultiviert.

Eidesstattliche Erklärung

Die selbstständige und eigenhändige Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der angegebenen Literatur versichert an Eides statt,

Berlin, den 30.11.2010

Tina Hänsel.

Danksagung

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Robert Koch-Institut und meines Diplomthemas danke ich Prof. Dr. Reinhardt Kurth.

Ich danke Frau Prof. Dr. Petra Radehaus für die externe Betreuung dieser Diplomarbeit seitens der Hochschule Mittweida und ihren unermüdlichen Einsatz für die Studentenschaft.

Herrn Dr. Joachim Denner danke ich sehr für seine Betreuung und die fachliche Unterstützung.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Vladimir Morozov für seine vielen nützlichen Ideen, seine fachlichen Anregungen und große Unterstützung aussprechen. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und die Möglichkeit ein Teil der *russian group* zu sein. Letztlich ist die *mission accomplished*.

Ebenso möchte ich Frau Ulrike Laube für ihre Hilfe bei der Immunfluoreszenzanalyse und der ganzen P13 AG Denner danken, die mich freundlich aufgenommen haben und in jeder Beziehung ein offenes Ohr hatten und helfende Worte fanden.

Ich danke meinen Eltern für ihre finanzielle und moralische Unterstützung während meines Studiums und den Rückhalt, den sie mir geben. Ich danke auch meinem Freund, Sebastian Kessler, für die Motivation und die ernsten Worte, die maßgebend zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung.....	5
Referat	5
Danksagung.....	7
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	10
1.1 Klassifikation der Viren.....	10
1.2 Retroviren und HIV	11
1.2.1 Morphologie und Genom von HIV-1	13
1.2.2 Infektionswege und die Übertragung von HIV	15
1.2.3 HIV-Replikationszyklus	16
1.2.4 Das virale Hüllprotein <i>Env</i>	18
1.2.5 Die viralen Hüllproteine gp120 und gp41	18
1.2.6 Immunantwort des Körpers bei der HIV-Infektion	20
1.3 Epidemiologie des HI-Virus	22
1.3.1 Therapieansätze.....	23
1.3.1.1 Hochaktive Antiretrovirale Therapie (HAART).....	23
1.3.1.2 Gentherapie	24
1.3.1.3 Konzeptionierung eines Impfstoffes gegen HIV	25
1.3.1.3.1 Inaktivierte HIV-Viruspräparate.....	25
1.3.1.3.2 Attenuierte HI-Viren.....	26
1.3.1.3.3 gp41 und andere rekombinante Proteine als Antigene	26
1.3.1.3.4 Einsatz synthetischer Peptide	27
1.3.1.3.5 Rekombinante Vektorsysteme	27
1.3.1.3.6 Rekombinante DNA-Impfstoffe	28
1.4 Immunisierung mit transmembranen Proteinen von Retroviren. Ergebnisse der Arbeitsgruppe Denner	28
1.5 Zielsetzung	29

2	Materialien und Methoden	31
2.1	Materialien	31
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Geräte	32
2.1.3	Hilfsmittel	32
2.1.4	Kits	33
2.2	Zellkultur	33
2.2.1	Zellen	33
2.2.2	Zellkulturmedien	34
2.2.3	Kultivierung der Zellen in Medium mit FKS	34
2.2.4	Herstellung von Gefrierkulturen	35
2.2.5	Selektion von 293T-Zellen in Medium ohne FKS	35
2.2.6	Selektion transfizierter 293T-Zellen mittels dem Einsatz von Filtern	37
2.2.7	Transfektion von Plasmid-DNA	37
2.2.8	Analyse der Proteine in transfizierten Zellen	38
2.2.8.1	Gewinnung von Proteinen aus Zelllysaten	38
2.2.8.2	Aufreinigung der Überstände transfizierter Zellen	38
2.2.8.3	Extraktion genomischer DNA	39
2.2.9	SDS-PAGE der Zelllysate und exprimierter Proteine	39
2.2.10	Western Blot-Detektion	40
2.2.11	Immunofluoreszenzanalyse	40
2.3	Arbeiten mit Bakterien	41
2.3.1	Bakterien	41
2.3.2	Medien zur Kultivierung von Bakterien	42
2.3.3	Transformation von Plasmid-DNA	43
2.3.4	Kultivierung von Bakterienkulturen	43
2.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA	43
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	45
2.3.7	Gelextraktion	45
2.3.8	Klonierung	46
2.3.8.1	Plasmide	46
2.3.8.2	Enzyme	46
2.3.8.3	Primer	47
2.3.8.4	Restriktion	47

Inhaltsverzeichnis

2.3.8.5	Ligation	48
2.3.8.6	Site-Directed Mutagenesis (SDM).....	48
2.3.8.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
2.3.8.8	Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (real time-PCR)	50
2.3.8.9	Sequenzierung.....	51
2.4	Immunisierung und Analyse tierischer Seren	51
2.4.1	Versuchstiere.....	51
2.4.2	Aufarbeitung tierischer Seren	51
2.4.3	Immunisierung der Versuchstiere	52
2.4.4	Kommerzielle Antikörper	53
2.4.5	Western Blot-Analyse	53
2.4.6	Epitopmapping	54
2.4.7	ELISA (Enzym Linked Immunoabsorbent Assay)	56
2.4.8	Analyse der Seren auf neutralisierende Eigenschaften	57
2.4.8.1	Virusherstellung	57
2.4.8.2	Bestimmung des Virustiter	58
2.4.8.3	Neutralisationstest.....	58
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Immunisierung mit rgp41 zur Gewinnung neutralisierender Antikörper	60
3.1.1	Produktion von rgp41 durch Transfektion mit pcDNASeA2	60
3.1.2	Immunisierung und Analyse der Immunsereen	61
3.1.2.1	Immunisierungsmodus	61
3.1.2.2	Nachweis gp41-spezifischer Antikörper im Western Blot	62
3.1.2.3	Analyse der Epitope	63
3.1.2.4	Analyse neutralisierender Seren im Neutralisationstest	65
3.2	Etablierung einer rgp41-produzierenden Zelllinie.....	67
3.2.1	Design und Schritte zur Etablierung einer permanent exprimierenden Zelllinie	67
3.2.2	Klonierung eines neuen Vektors zur Expression des rgp41	68
3.2.3	Mutation der immunsuppressiven Domäne (ISD) des gp41	69
3.2.4	Expression von rgp41 nach Transfektion von 293T-Zellen	70
3.2.5	Ergebnisse der Selektion mit Geneticin (G-418)	71

Inhaltsverzeichnis

3.2.6	Nachweis des viralen Genoms in selektierten Zellklonen durch Real Time-PCR	73
3.2.7	Schritte zur Expressionsoptimierung	77
3.2.8	Demethylierung der Zellklone mit 5-Azacytidin	78
3.2.9	Nachweis der Expression von gp41 mittels Immunofluoreszenz	80
3.3	Etablierung der Zellklone in FKS-freiem Medium	81
4	Diskussion	83
4.1	Notwendigkeit eines HIV-Impfstoffes	83
4.2	Vorteile der Produktion von gp41 in humanen Zellen	83
4.3	Geringe Antigenmengen mit pcDNaseA2 Vektor	84
4.3.1	Immunisierung mit geringen Dosen von rgp41	84
4.4	Expression von rgp41 durch pTargeT	85
4.4.1	Transfektion und Methylierung	86
4.4.2	Detektion viralen Genoms in selektierten Klonen	87
4.4.3	Methylierung unterbindet Antigenexpression in einer Zelllinie	87
4.4.4	Kultivierung selektierter Klone in FKS-freiem Medium	88
4.4.5	Einfluss der Expression von gp41 auf die Zellmorphologie	88
5	Zusammenfassung	89
	Literaturverzeichnis	90
	ANHANG	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Phylogenie von Retroviren.....	12
Abbildung 1.2	Ansichten des Humanen Immunschwäche-Virus	13
Abbildung 1.3	Schema der Genomstruktur von HIV-1	14
Abbildung 1.4	Fusion des HIV-1 mit einer Zelle.....	16
Abbildung 1.5	Replikationszyklus des HIV-1	17
Abbildung 1.6	Strukturelle Anordnung der Hüllproteine des HIV	18
Abbildung 1.7	Schematische Darstellung des Glykoprotein gp41	19
Abbildung 1.8	Die planare Projektion des Glykoproteins gp41	19
Abbildung 1.9	Verlauf einer HIV-Infektion ohne Behandlung.....	22
Abbildung 1.10	Mögliche Angriffspunkte einer HIV-Therapie im Laufe des Infektionszykluses des HI-Virus	24
Abbildung 1.11	Mögliche HIV-Impfstoffstrategien	25
Abbildung 3.1	Nachweis exprimierten Proteins rgp41 für die Immunisierung der Versuchstiere	61
Abbildung 3.2	Immunisierungsplan der Ratten und der Ziege	61
Abbildung 3.3	Western Blot-Analyse der Seren immunisierter Wistar Ratten.....	62
Abbildung 3.4	Schematische Übersicht über die auf eine Nitrocellulosemembran mittels Multikanalpipette gespoteten Peptide	63
Abbildung 3.5	Ergebnisse des Epitopmappings der Rattenseran.....	64
Abbildung 3.6	Neutralisationstest mit den Seren der immunisierten Ratten und der Ziege..	65
Abbildung 3.7	Bestimmung der Neutralisationsaktivität verschiedener Rattenseran	66
Abbildung 3.8	Notwendige Schritte zur Etablierung einer Zelllinie.....	67
Abbildung 3.9	geschnittenes Insert der Restriktion von pTargetSe und pTargetSeA2	68
Abbildung 3.10	Unterschied der Expressionsvektoren pTargetSe und pTargetSeA2	69
Abbildung 3.11	293T-Zellen exprimieren 2 Tage nach der Transfektion das rekombinante virale Hüllprotein gp41	70
Abbildung 3.12	Struktur des Antibiotika Geneticin.....	71
Abbildung 3.13	Inhibierung der rgp41 Expression innerhalb einer Woche.....	71
Abbildung 3.14	Zelllysate selektierter Zellen 2 Wochen nach Transfektion.....	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.15	Repräsentative Ergebnisse extrahierter DNA der Klone aus 600 µg/ml G418-Selektion.....	73
Abbildung 3.16	Repräsentative Ergebnisse der genomischen DNA der 600 µg/ml G418-Selektion.....	74
Abbildung 3.17	Repräsentativer Auftrag der amplifizierten Proben-DNA nach der RT-PCR-Analyse.....	75
Abbildung 3.18	Struktur der Demethylasen 5-Azacytidin und n-Butyrat.....	77
Abbildung 3.19	Vorgehensweise für die permanente Expression von rgp41	78
Abbildung 3.20	rgp41-Expression in transfizierten Zellen unter Einwirkung von 5-Azacytidin	79
Abbildung 3.21	Immunofluoreszenzaufnahmen rgp41 exprimierender Klone.....	80
Abbildung 3.22	Morphologieveränderungen als Reaktion auf die Selektion	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Virale Proteine und deren Funktion	15
Tabelle 2.1	Kombinationvarianten von Serum-freiem Medium für die Selektion von 293T-Zellen	36
Tabelle 3.1	Zusammenfassung der Analyse aller selektierten Zellkulturklone in der Real Time-PCR	77

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abb.</i>	Abbildung
<i>AIDS</i>	A cquired I mmunode f iciency S yndrom (dt. Erworbenes Immunschwächesyndrom)
<i>BSA</i>	B ovine serum a lbumin (dt. Fötales Kälberserum)
<i>bp</i>	b ase p airs (dt. Basenpaare)
<i>C1/C6</i>	konservierte Bereiche des gp120
<i>CCR5/ CXCR4</i>	Chemokin- und Cytokinrezeptor
<i>CD4/ CD8</i>	T-Helferzellen der menschlichen Immunantwort
<i>DMEM</i>	D ulbeccos M odified E agle M edium
<i>DNA</i>	D esoxyribonuklein a cid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
<i>EB</i>	E lution b uffer (dt. Elutionspuffer)
<i>env</i>	e nvelope protein (dt. Virale Hüllproteine)
<i>FeLv</i>	F elines L eukämie v irus
<i>FKS</i>	F ötales K älberserum
<i>FP</i>	F usions p eptid
<i>FPPR</i>	F usions d omäne
<i>gag</i>	codiert strukturelle Kernproteine
<i>gp</i>	G lyko p rotein
<i>HAART</i>	H och a ktive a ntiretrovirale T herapie
<i>HIV/ HI-Virus</i>	H uman I mmunode f iciency- V irus (dt. Humanes Immunschwäche-Virus)
<i>HR1/ HR1</i>	H epta t R epeat
<i>HTLV</i>	H umanes T -lymphotropes V irus
<i>IL</i>	I nterleukin
<i>ISD</i>	i mmunsuppressive D omäne
<i>kb</i>	K ilo b asenpaar
<i>kD</i>	K ilo d alton
<i>KoRV</i>	K oala R etrovirus
<i>LTR</i>	l ong t erminal r epeat
<i>MPER</i>	m embran p roximale e xterne R egion
<i>Net</i>	R egulatorprotein

Abkürzungsverzeichnis

<i>NK-Zellen</i>	n atural k iller cells (dt. Natürliche Killerzellen)
<i>PBMC</i>	P eripheral B lood M ononuclear C ell
<i>PBS</i>	p hosphat b uffered s aline (dt. Phosphatgepufferte Salzlösung)
<i>PCR</i>	P olymerase C hain R eaction (dt. Polymerase Kettenreaktion)
<i>PERV</i>	Porcines endogenes Retrovirus
<i>pro</i>	P rotease
<i>pol</i>	P olymerase
<i>p18/p24</i>	P rotein
<i>Rev</i>	Regulatorprotein
<i>RKI</i>	R obert K och- I nstitut
<i>RNA/ mRNA</i>	R ibonukleinacid (dt. Ribonukleinsäure)/ messenger RNA
<i>rpm</i>	r evolution p er m inute
<i>RRE Element</i>	r ev r esponse e lement
<i>RT</i>	R aumtemperatur
<i>SIV</i>	S imian I mmunodeficiency V irus (dt. Affen- Immunschwächevirus)
<i>SU</i>	s ubunit (dt. Untereinheit)
<i>Tab.</i>	T abelle
<i>TAR Element</i>	t rans- a ctivation r esponse
<i>Tat</i>	Transaktivator der Transkription
<i>TM</i>	T rans m embraneinheit
<i>UNAIDS</i>	HIV und AIDS Hilfe der Vereinten Nationen
<i>Vpr</i>	virales Protein r
<i>V1/V5</i>	variable Bereiche des gp120
<i>WHO</i>	W orld H ealth O rganisation (dt. Weltgesundheits- organisation)
<i>üN</i>	ü ber N acht

1 Einleitung

Wie der Philosoph Arthur Schopenhauer einst sagte, ist „Gesundheit [...] nicht alles, doch ohne Gesundheit ist alles nichts“. Weltweit wird der höchste erreichbare Gesundheitszustand in der Allgemeinen Erklärung der Menschenrechte der Vereinten Nationen als zentrales Menschenrecht definiert: So beschreibt der Artikel 25, dass „[j]eder Mensch [...] das Recht auf einen Lebensstandard [hat], der seine und seiner Familie Gesundheit und Wohl gewährleistet, einschließlich Nahrung, Kleidung, Wohnung, ärztliche Versorgung und alle anderen notwendigen sozialen Leistungen“ begünstigt (IGFM, 2010).

Das Recht auf den größtmöglichen Gesundheitsstandard wird allerdings gegenüber einem Drittel der Weltbevölkerung, im Besonderen armen Menschen in Entwicklungsländern, gebrochen. Weltweit wird beobachtet, dass das Auftreten schwerer Krankheiten mit der Verbreitung der Armut korreliert. Die Lebensbedingungen, die durch unzureichende Ernährung, mangelnde Bildung, Arbeitslosigkeit und schlechte Wohnbedingungen einhergehen, wirken sich stark auf den Gesundheitszustand einer Bevölkerungsgruppe aus. Des Weiteren begünstigt Armut den Einstieg in die Prostitution und den Drogenkonsum, welche beide mit einem großen gesundheitlichen Risiko verbunden sind.

Besonders Viren stehen als wichtige Pathogene im Hinblick auf ihren Einfluss auf den Gesundheitszustand im Blickpunkt. Betrachtet man die Entwicklung der Lebenserwartung im Zusammenhang mit der weltweiten Pandemie durch das Humane Immunschwäche-Virus (HIV) und der damit einhergehenden Krankheit AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom) so lassen sich heute wieder höhere Sterblichkeitsraten verzeichnen. Obwohl es in den 1990er Jahren zu einer Steigerung der Lebenserwartung mit AIDS und einer HIV-Infektion kam, werden nun wieder rückläufige Zahlen beschrieben.

1.1 Klassifikation der Viren

Der Begriff *Virus* wird aus dem Lateinischen *venenifer* oder *virulentus* mit dem Ausdruck *Gift* übersetzt. Während des gesamten 19. und noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts war der Begriff *Virus* repräsentativ für alle Arten infektiöser Erreger, die bis dahin nicht genau definiert werden konnten. Heute werden lediglich submikroskopische Erreger als Viren bezeichnet, die kleiner als 0,3 μm sind.

Seit der Beschreibung von Viren als eine eigene Erregergruppe durch IVANOWSKI (1892), wird der Ausdruck ausschließlich für diese besonderen Krankheitserreger genutzt. Neben ihrem einfachen strukturellen Aufbau, ist auch ihre Größe von etwa 22 nm (Parvo-Virus B19)

bis 300 nm (Pockenviren) typisch (HAHN *et al.*, 2008). Sie bestehen aus Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden, besitzen aber keine Ribosomen und Mitochondrien. Als obligate Zellparasiten ohne eigenen Energiestoffwechsel dringen sie in eine Wirtszelle ein und nutzen die Syntheseprozesse der Wirtszelle zur Vermehrung. Sie schleusen virusspezifische Proteine und ihre genetische Information in den Wirt ein, was mit einem schnellen Zelltod des Wirtes einhergeht. Der Zelltod der Wirtszelle setzt eine Fülle von neuen Viren frei. Bisher sind vier Zustandsformen der Viren bekannt. Zum einen als Viruspartikel oder Virion außerhalb der Zelle, als Ansammlung viraler Bestandteile, als in das Genom der Wirtszelle integriertes DNA-Replikat des viralen Genoms (als Provirus) und als zirkuläres DNA-Genom, auch Episom genannt außerhalb des Wirtsgenoms, aber im Kern der Wirtszelle (Herpesviren, Papillomaviren, u.a.) (HAHN *et al.*, 2008). Die Wirtsspezifität ermöglicht eine Unterscheidung innerhalb der Gruppe der Viren.

1.2 Retroviren und HIV

Im Jahr 1959 wurde in Zaire (Demokratische Republik Kongo) eine infektiöse Erkrankung beschrieben, die später als HIV-Infektion bekannt wurde (NAHMIAS *et al.*, 1959). Die ersten flächendeckenden Beobachtungen auf diesem Gebiet machten GOTTLIEB *et al.* (1981) im Jahre 1981, während sie einer auffälligen Häufung seltener Pilzerkrankungen (*Pneumocystis carinii*) und Zytomegalieviren bei jungen, homosexuellen Männern nachging. Trotz körperlicher Fitness zeigten die Patienten verminderte T-Helferzellzahlen, die bis dahin nur bei deutlich immunsupprimierten Patienten bekannt waren. Somit wurde der Verdacht einer erworbenen zellulären Immunschwäche (Acquired Immunodeficiency Syndrom), welche durch das Humane Immunschwäche Virus (HIV) ausgelöst wird, geäußert. Bei Retroviren handelt es sich um eine große Familie behüllter Viren, die tierische Zellen infizieren und sich in ihnen, durch den Einbau eigener viraler RNA als DNA-Provirus in das Wirtsgenom, replizieren. Diese Proviren initiieren die Bildung neuer Viren im Laufe der normalen Transkription der proviralen DNA (HILLER *et al.*, 2000). Das virale Genom besteht aus zwei RNA-Einzelsträngen. Kennzeichnend für alle Retroviren ist das Enzym der Reversen Transkriptase, welches im Infektionszyklus der Viren die Übersetzung der genomischen Virus-RNA in zelluläre DNA übernimmt. Innerhalb der Gruppe der Retroviren wird zwischen den Onkoviren (z.B. HTLV - Humanes T-lymphotropes Virus), den potentiell nicht human pathogenen Spumaviren und den Lentiviren unterschieden (Abb. 1.1). Zur Gruppe der Lentiviren gehören fünf Virenarten:

- (1) Bovine Lentiviren - Virus der equinen infektiösen Anämie (BIV) von Rindern,

Jembrana-Disease-Virus bei Rindern

- (2) Equine Lentiviren - Virus equiner infektiöser Anämie (EIAV) bei Huftieren (Esel, Pferd)
- (3) Feline Lentiviren – Felines Immunschwäche-Virus (FIV) bei Haus- und Großkatzen
- (4) Ovine oder caprine Lentiviren - Maedi-Visna-Virus (MVV) bei Schafen, Caprines Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV) bei Ziegen
- (5) Primaten-Lentiviren - Humanes Immunschwäche-Virus (HIV) beim Menschen, Simianes Immunschwäche-Virus (SIV) bei verschiedenen Affenarten

Allen gemein ist das pandemische oder epidemische Auftreten bei Menschen und Tieren.

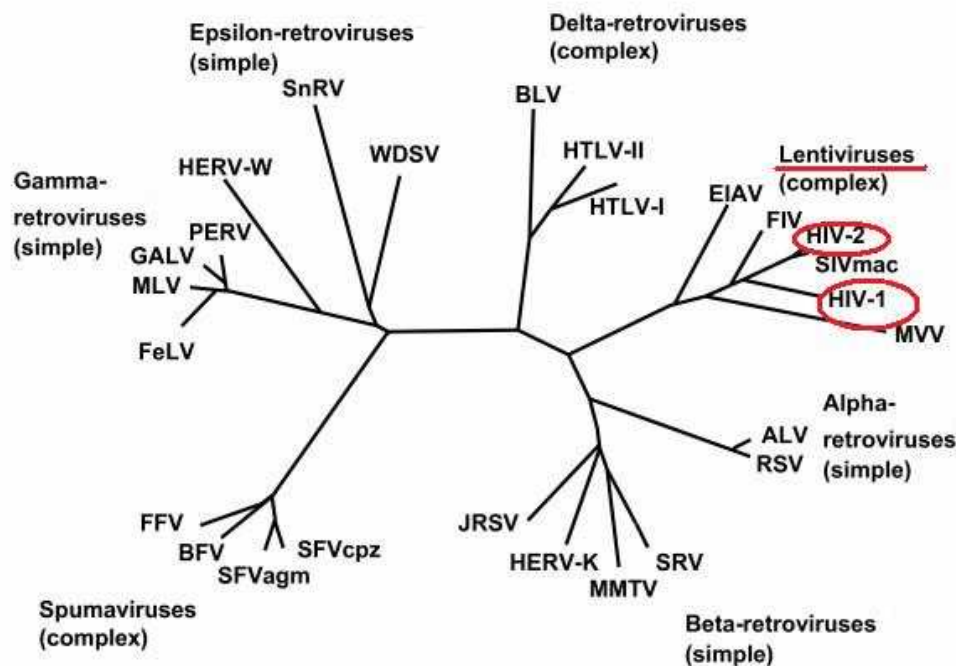


Abb.1.1: Phylogenie von Retroviren (WEISS, 2006)

Die Übertragung von Retroviren erfolgt sowohl horizontal durch Infektionen von einer zur anderen Person, als auch vertikal durch die Vererbung über die Keimbahn. Oftmals wird mit Retroviren die Umwandlung infizierter Zellen in abnorme Tumorzellen verbunden, doch auch die Beeinflussung des Immunsystems des Wirtes spielt bei einer Virusinfektion eine erhebliche Rolle. Neben dem für die meisten Infektionen verantwortlichen Humanen Immunschwäche-Virus Typ 1 wurde in den Jahren danach eine weitere Form, das Humane Immunschwäche-Virus Typ 2, entdeckt. Während HIV-1 weltweit verbreitet ist, kommt HIV-Typ 2 vorwiegend in den westlichen Teilen Afrikas, in Europa und Indien vor. Trotz äußerlicher Unterschiede stimmen nur etwa 60 % des Erbgutes überein. HIV-1 ist infektiöser

und bewirkt einen rascheren Krankheitsverlauf als HIV-2. Innerhalb beider Virusstämme existieren mehrere Untergruppen (M (major), N (new), O (outlier)).

1.2.1 Morphologie und Genom von HIV-1

Das Humane Immunschwäche-Virus wird der Familie der Lentiviren zugeordnet, die eine Untergruppe der Retroviren darstellt (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000). Retroviren besitzen komplexe Genomstrukturen aus zwei RNA-Einzelsträngen, die in einem kegelförmigen Kapsidkern eingelagert sind. Nach Außen grenzt sich das Virus durch eine Lipidhülle ab. Diese wird beim Austritt aus der Wirtszelle von dieser durch das Virus übernommen und verfügt demnach über alle relevanten zellulären Membranproteine, wie Glykoproteine. Beispiele für Glykoproteine sind das gp41, das in der viralen Membran verankert ist und das gp120, das durch nicht kovalente Bindungen mit dem gp41 verbunden ist. Beide Proteine entstehen aus dem Präkursor-Glykoprotein gp160.

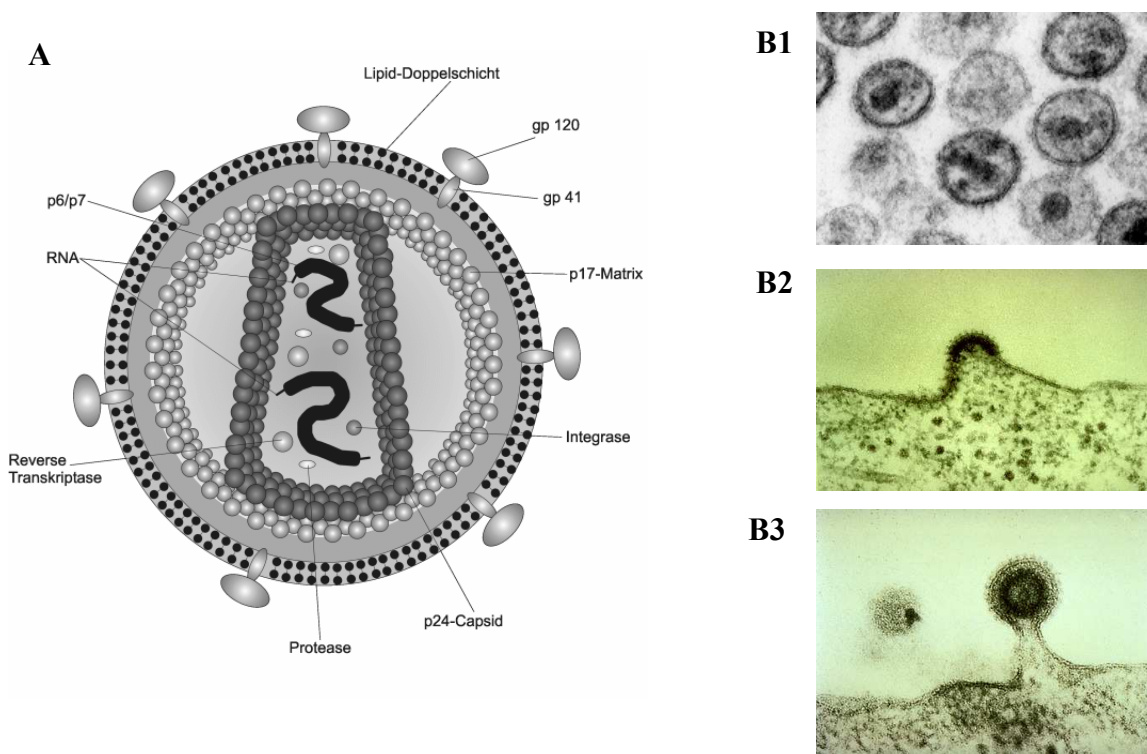


Abb.1.2: Ansichten des Humanen Immunschwäche-Virus

A: Schematischer Aufbau des HIV-1 (nach BEYER, 2004); **B:** Aufnahmen von HIV-Partikeln mittels eines Elektronenmikroskops (HERBECK, 2008): **B1** - intakte Viruspartikel ; **B2/B3** - ein sich von der Wirtszelle abschnürendes Virus

Einleitung

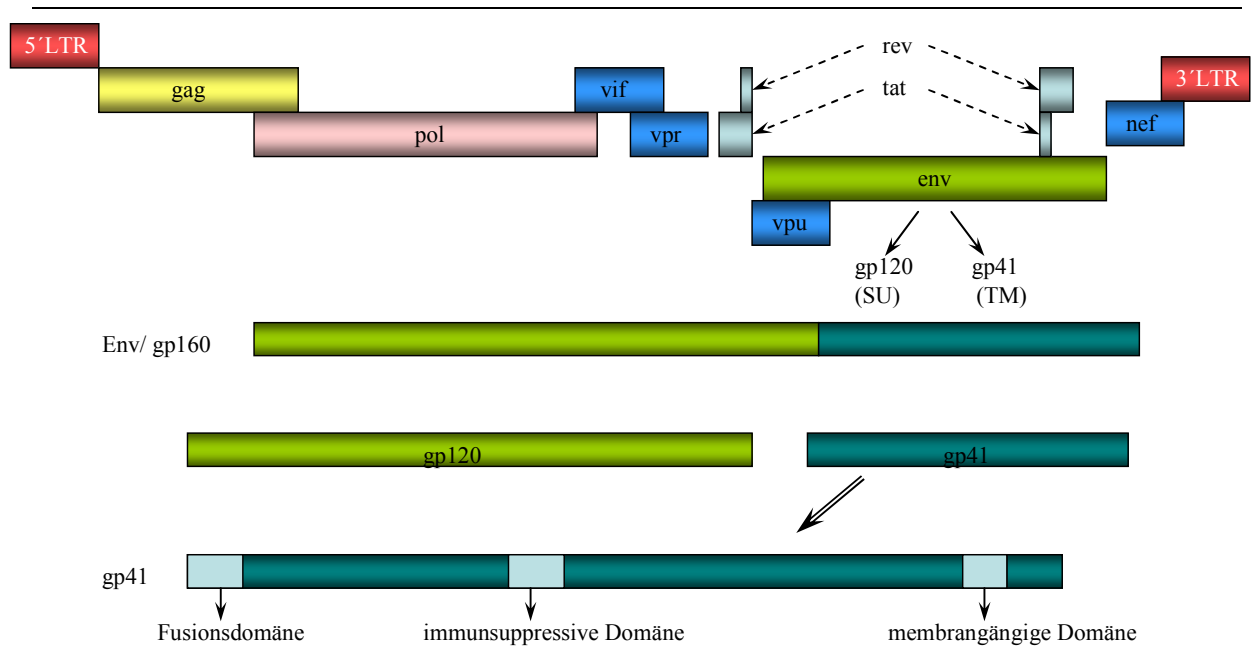


Abb. 1.3: Schema der Genomstruktur von HIV-1 (nach COSTIN , 2007)

Das virale Genom, mit einer Gesamtlänge von 9,4 kb liegt im Viruskern in Form zweier RNA-Einzelstränge vor, welche von zwei gleichlangen Long Terminal Repeats (LTR) flankiert werden. Am 5'-Ende der Stränge befinden sich 7-Methylguaninmoleküle und am 3'-Ende poly(A)-Schwänze (A für Adenin). In den flankierenden LTR-Regionen sind verschiedene Sequenzen codiert, die sowohl für das Umschreiben (Primer-Bindungsstelle) wie für die retrovirale Genexpression nötig sind (Promotor, Enhancerelemente). Das Genom des Humanen Immunschwäche-Virus kodiert neben den drei großen Vorläuferproteinen *gag* (Strukturproteine des Viruskerns), *pol* (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease) und *env* (Hüllproteine), noch weitere Regulator-, Struktur- und akzessorische Proteine (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Virale Proteine und deren Funktion

Virale Proteine von HIV-1 und ihre Funktion			
Strukturproteine des Viruskerns	<i>gag</i>	p6/p7	Kapsidprotein
	<i>gag</i>	p17	Matrixprotein
	<i>gag</i>	p9, p21	Nukleokapsidprotein
Reverse Transkriptase	<i>pol</i>	p55, p63	Umschreiben der viralen RNA in DNA
Protease	<i>pol</i>	p15	
Integrase	<i>pol</i>	p11, p32	Prozessierung der Strukturproteine Integration ins Wirtsgenom
Hüllproteine	<i>env</i>	gp120	Bindung an zellulären Rezeptor
	<i>env</i>	gp41	Membranfusion
Regulatorische Proteine	<i>tat</i>		Transaktivierung des Promotors
	<i>rev</i>		Expression viraler mRNA
	<i>nef</i>		Herunterregulation des Virusrezeptors u.a.
Akzessorische Proteine	<i>vpr</i>	p6	Virusreifung, Transmission, Replikation
	<i>vpu</i>		
	<i>vif</i>		

gag-Vorläuferproteine werden durch virale Proteasen in verschiedene Proteine gespalten, die sich in freigesetzten infektiösen Viruspartikeln nachweisen lassen. *pol*-Proteine codierten RNA-abhängige DNA-Polymerasen, welche Proteasen, Reverse Transkriptasen und Integrasen vereinen. In der dritten Gruppe werden *envelope*-Proteine, kurz *env*, beschrieben, und codiert wichtige Glycoproteine, Bestandteile der retroviralen Cytoplasmamembran (KNIPPERS, 2006). Aus einem Vorläuferprotein gehen hier ein Oberflächen- (SU) und ein transmembranes (TM) Protein durch Spaltung im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgiapparat der Wirtszelle hervor.

1.2.2 Infektionswege und die Übertragung von HIV

Eine Infektion mit dem HI-Virus erfolgt über den Austausch von Körperflüssigkeiten, wie Blut, Sperma oder Vaginalflüssigkeit. Zu Risikogruppen zählen demnach Menschen mit ungeschützten Sexualkontakten, Prostituierte und Drogenkonsumenten, die auf Einwegspritzenbesteck verzichten oder sogenanntes „needle-sharing“ betreiben. Andere Übertragungswege, wie durch Bluttransfusionen, Organspenden, sind abhängig von der Viruslast des infizierten Blutes, auf Grund diverser Vorsichtsmaßnahmen und Bluttests gering. Auch die Übertragung von HIV beim Geschlechtsverkehr liegt, abhängig von der

Viruslast des Infizierten und vorhandenen Schleimhautverletzungen, durchschnittlich bei 0,5 %. Durch die Samenflüssigkeit eines HIV-positiven Mannes können hierbei bis zu 50 freie Viruspartikel/ml Blut und 5×10^4 infizierte Lymphozyten übertragen werden, welches einen Anteil von 5 % der insgesamt 10^6 übertragenen Lymphozyten ausmacht (LEVY, 1993). Bei der Übertragung von HIV durch kontaminierte Blutprodukte kann das Virus sowohl in Form von freien Viruspartikeln als auch durch infizierte Zellen übertragen werden.

1.2.3 HIV-Replikationszyklus

Die Infektion von Wirtszellen erfolgt über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus, bei dem die Glykoproteine der Virushülle mit den Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren. Das HI-Virus infiziert vorwiegend Zellen mit membranständigem CD4-Rezeptor (z.B. T-Lymphozyten). Neben dem CD4-Rezeptor fungieren Chemokinrezeptoren als Korezeptoren für den Eintritt in die Zelle (CCR5 oder CXCR4 als Korezeptoren) (BERGER *et al.*, 1999; DOMS, 2001; MOORE *et al.*, 2004; ZAITSEVA *et al.*, 2003). Anschließend fusioniert die Virushülle mit der Plasmamembran, so dass das Viruskapsid in das Zellinnere gelangt.

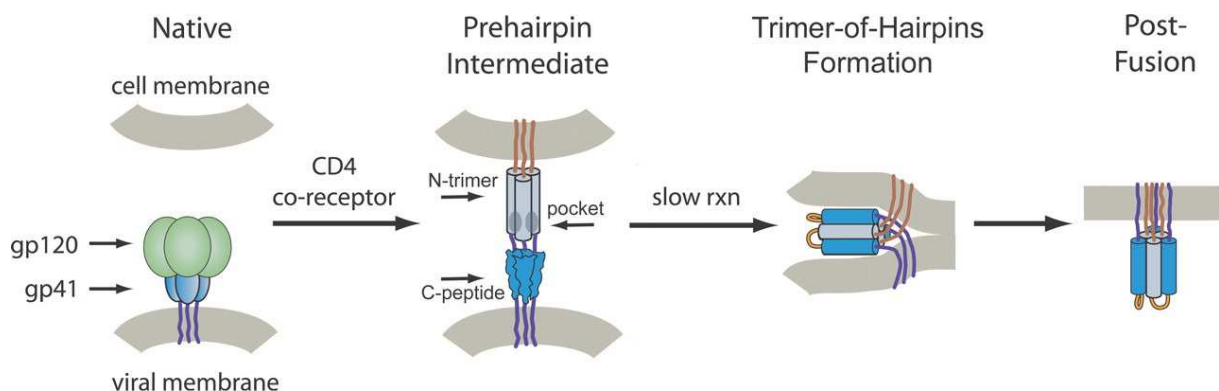


Abb. 1.4: Fusion des HIV-1 mit einer Zelle [WELCH *et al.*, 2007]

Die auf der viralen Lipidhülle befindlichen Glykoproteine gp120 und gp41 sind für die Infektion der Wirtszelle notwendig. Hierfür bindet das gp120 an den CD4-Rezeptor der Zielzelle. Durch eine Umfaltung des gp120 wird das nicht kovalent gebundene gp41 offen gelegt, um die Fusion der Zellmembran mit der Virusmembran zu induzieren (WYATT *et al.*, 1998). Der Viruseintritt wird ermöglicht. Im Zytoplasma der Wirtszelle übersetzt die Reverse Transkriptase das einzelsträngige virale Genom in eine doppelsträngige DNA-Kopie. Anschließend wird das DNA-Molekül als Präintegrationskomplex aktiv in den Wirtszellkern

transportiert und beliebig im zellulären Genom integriert (SCHRODER *et al.*, 2002), wodurch zelluläre Gene zerstört oder deren Transkription aktiviert werden kann. Die Integration ist Voraussetzung für die Vermehrung des Virus. (NEKHAI *et al.*, 2006) Nach der Translation der strukturellen und enzymatischen viralen Proteine erfolgen posttranslationale Modifizierungen der Vorläuferproteine (Phosphorylierungen und Glykosylierungen). Es lagern sich virale Proteinkomponenten (virale Strukturproteine und akzessorische Polypeptide) an der Wirtsmembran mit dem Virusgenom zusammen und die Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche wird ermöglicht. Nach der Freisetzung kommt es zur Nachreifung der Viruspartikel durch die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease und durch strukturelle Umlagerungen (siehe auch (FREED, 2001; SIMON *et al.*, 2006)) innerhalb der freigesetzten Viruspartikel (Abb. 1.5).

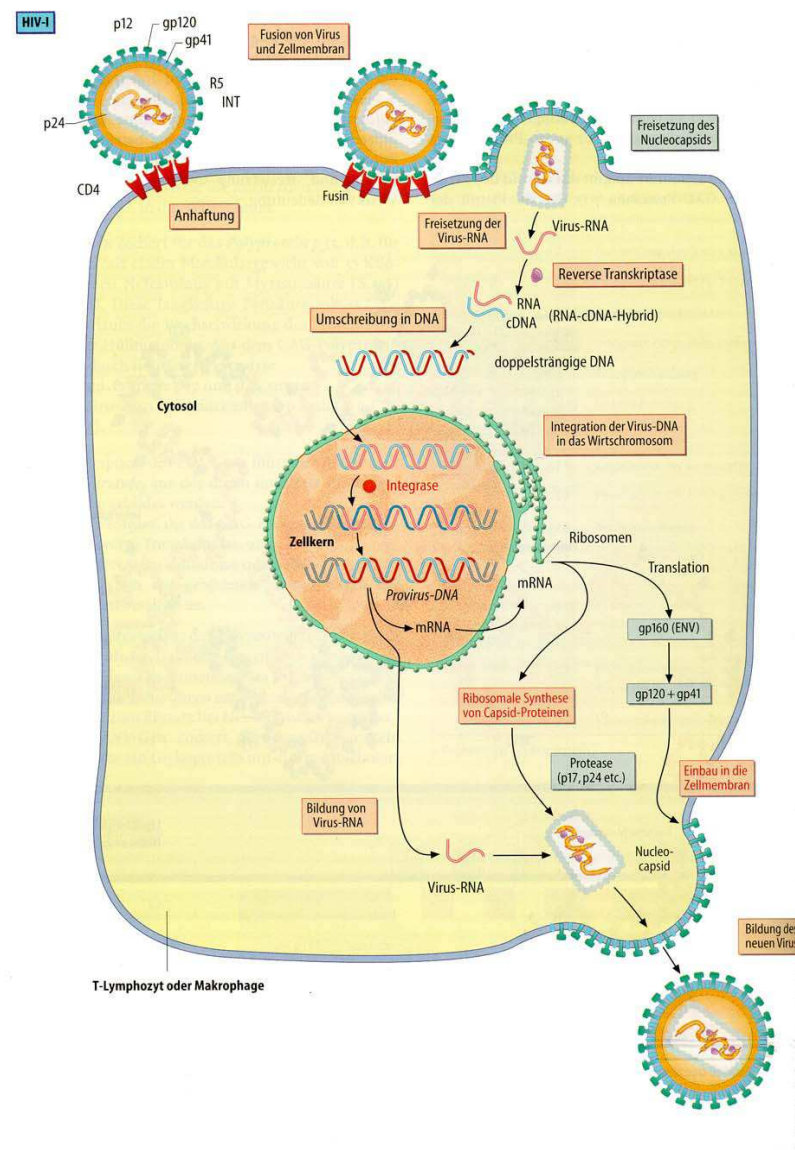


Abb. 1.5: Replikationszyklus des HIV-I (LÖFFLER *et al.*, 1997)

1.2.4 Das virale Hüllprotein *Env*

Die HIV-Glykoproteine werden als Vorläuferprotein gp160 synthetisiert, das nachfolgend in die beiden Untereinheiten gp120 (SU) und gp41 (TM) gespalten wird. Im Gegensatz zu den anderen HIV-Polypeptiden erfolgt die proteolytische Spaltung in die SU- und die TM-Domäne durch zelluläre Proteasen. Die Glykoproteine liegen auf der Membran infizierter Zellen und in der späteren Virusmembran in oligomerer Form vor. Das Molekulargewicht aller drei Proteine ist durch die Stärke der Glykolysierung bestimmt. Mehr als 80 % der 30 Glykolysierungsstellen liegen innerhalb der gp120-Domäne. Diese starke "Verzuckerung" des Proteins beeinträchtigt die vollständige Aufklärung der räumlichen Struktur in der Röntgenstrukturanalyse.

1.2.5 Die viralen Hüllproteine gp120 und gp41

Die Virusmembran vereint bis zu 72 Hüllprotein-Komplexe, deren Grundstruktur ein Trimer ist. Die Untereinheiten gp41 (41 kD) und das nicht kovalent gebundene gp120 (120 kD) zeichnen sich durch hypervariable und immunodominante Domänen aus. Im Falle des gp41 sind diese für die Bildung spezifischer Antikörper entscheidend.

Die Immunantwort des Körpers übt durch die Bildung spezifischer Antikörper einen hohen Selektionsdruck auf das Virus aus. Diese Immunselektion führt in Verbindung mit einer hohen Lesefehlerrate bei der Reversen Transkriptase zur kontinuierlichen Veränderung des Virus und erhöht damit die Variation des HIV.

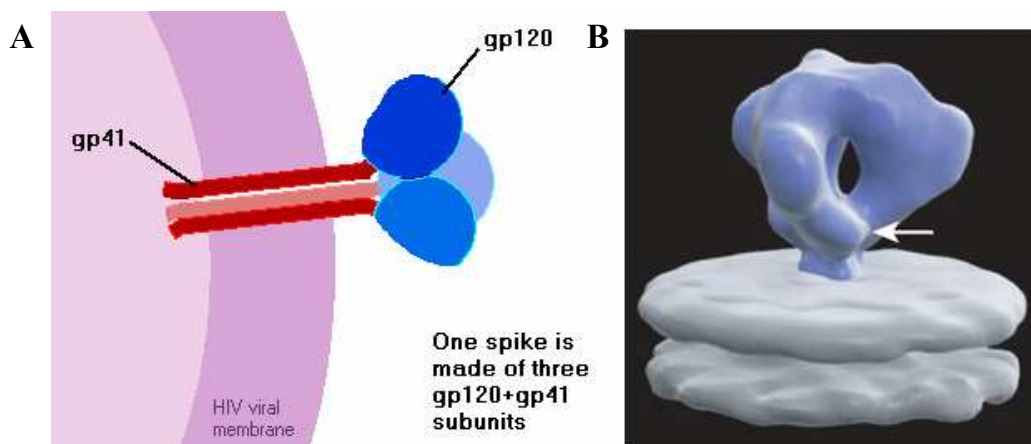


Abb. 1.6: Strukturelle Anordnung der Hüllproteine des HIV

A: Schematische Darstellung der Anordnung der Glykoproteine im Komplex gp160 [KWONG *et al.*, 1998]

B: 3D-Struktur der Konformation der gp41 (weißer Pfeil) und gp120 in der viralen Membran [LIU, 2008]

Gp41 (Abb. 1.7) hat verschiedene funktionale Bereiche, wie die Fusionsdomäne (FPPR), die Heptad Repeat-Domänen und die membranproximale externe Region (MPER) sichtbar.

Dieser Abschnitt ist Bindungsstelle für die bisher bekannten neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 und ist Angriffspunkt der Entwicklung weitere Impfstoffkonzepte.

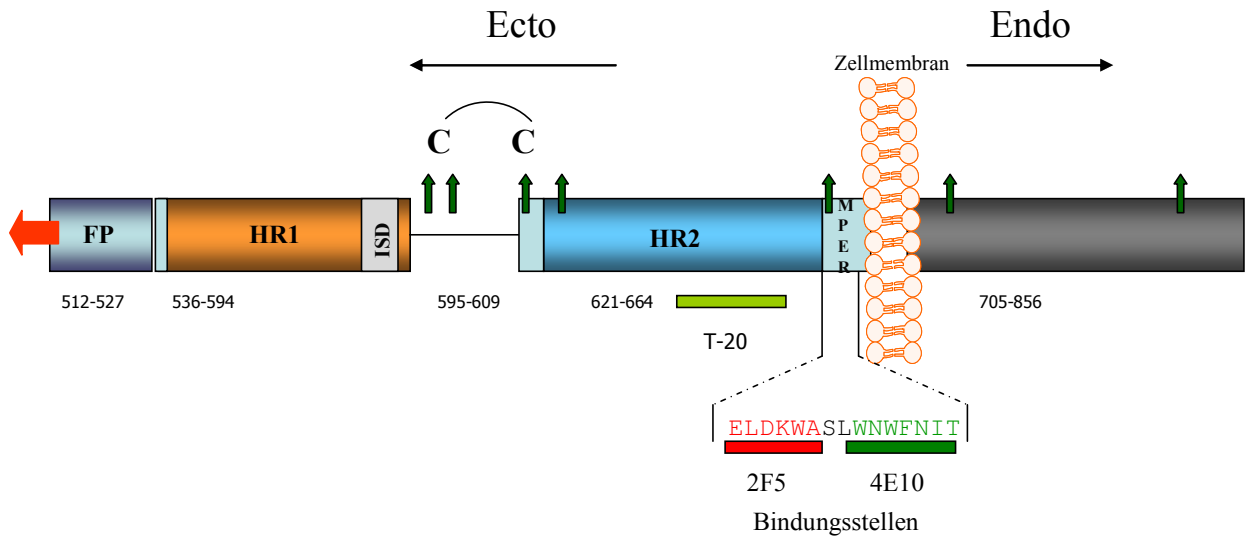


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Glykoprotein gp41

FP - Fusionspeptid; HR1/ HR2 - Heptat Repeat 1 und 2; ISD - Immunsuppressive Domäne; MPER - membranproximale externe Region

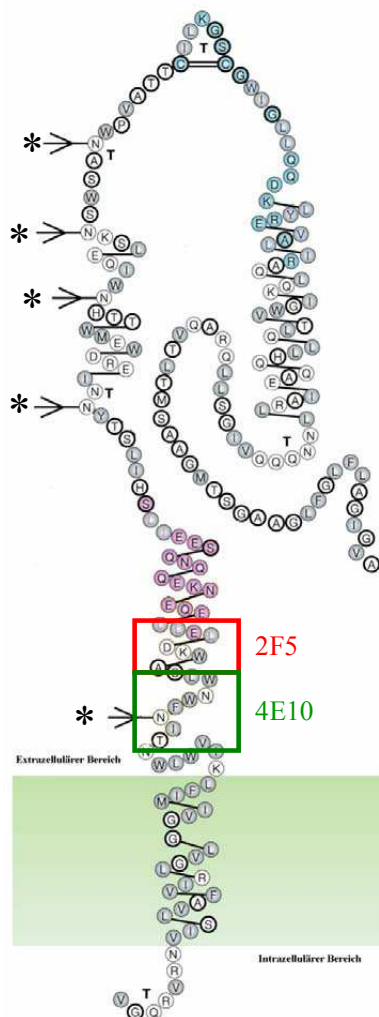


Abb. 1.8: Die planare Projektion des Glykoproteins gp41.

Die α -Helices wurden als kurze Linien alternierend mit drei oder vier Aminosäuren dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren wurden grau, geladene Aminosäuren nicht unterlegt. Neutrale Aminosäuren wurden dick umrandet und gut charakterisierte Epitope farblich markiert.

Stabile Schleifen wurden mit einem T versehen und potentielle Glykosylierungsstellen als verzweigter Ast dargestellt (* Pfeil). Die Lipiddoppelschicht wurde grün und eine Disulfidbrücke mit zwei Strichen angedeutet. (LEVY, 1993 und GALLAHER, 1989).

Die Bindungsstellen der Antikörper 2F5 (rot) und 4E10 (grün) sind gekennzeichnet.

In der Untereinheit gp120 (SU) treten alternierend variable Regionen (V1-V5) und stärker konservierten Bereichen (C1-C6) auf (WYATT *et al.*, 1993). Letztere bilden den Kern von der Untereinheit, der aus einer inneren und einer äußeren Domäne sowie dem die beiden Domänen verbindenden *bridging sheet* besteht (KWONG *et al.*, 1998). V1-V4 bilden variable Schleifen (*loops*), die durch Disulfidbrücken an ihren Basen stabilisiert werden (LEONARD *et al.*, 1990). Variable Schleifen und stark glykosylierte Kernbereiche (u.a. die Stammbereiche der V1-V4 *loops* sowie V5) formen die Oberfläche von gp120. Besonders die V1/V2- und V3-Schleifen haben flexible Strukturen, so dass ein Austausch von Aminosäuren in diesen Bereichen toleriert werden kann.

Gp41 ist ein integrales Membranprotein, das aus der membranseitigen Ectodomäne, der integralen Transmembrandomäne und dem cytoplasmatischen, carboxyterminalen *tail* besteht (ECKERT UND KIM, 2001). Innerhalb der Ectodomäne liegen glycinreiche, hydrophobe Regionen, sogenannte Fusionspeptide und zwei hydrophobe 4,3 *heptad repeats* (HR1 und HR2) (Abb. 1.8). Dazwischen befindet sich eine *loop*-Region, die zwei Cysteine enthält (DELWART *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu gp120 ist die Aminosäuresequenz von gp41 stark konserviert. Besonders im Bereich der Domänen FPPR, ISU und MPER treten nur wenige Variationen (CHAN UND KIM, 1998) auf. Es wird vermutet, dass gp41 in mindestens zwei verschiedenen Hauptkonformationen vorkommt (CHAN *et al.*, 1997). Auf der Oberfläche von freien Virionen liegt es in der nativen, nicht fusogenen Konformation vor. Durch eine Konformationsänderung des gp120 bei der Virusinfektion wird eine zweite Konformation freigelegt (CHAN *et al.*, 1997). In der fusionsaktiven Konformation bilden die *heptad repeat*-Regionen ein α -helikales Trimer aus antiparallel angeordneten HR1/HR2-Dimeren, das sogenannte sechs-Helix-Bündel (CHAN *et al.*, 1997; TAN *et al.*, 1997; WEISSENHORN *et al.*, 1997). Bisher wurden zwei neutralisierende Antikörper für gp41 beschrieben, die sequenzspezifisch an den zwei Epitopen, 2F5 und 4E10 binden. Beide Antikörper wurden aus Isolaten HIV-positiver Patienten gewonnen. Durch die Anbindung in membranproximalen Abschnitten der Ectodomäne des gp41 kommt es bereits in geringen Konzentrationen an Antikörper zur Inhibierung des Virus.

1.2.6 Immunantwort des Körpers bei der HIV-Infektion

Werden die primären und chemischen Barrieren des Körpers, wie die Haut, Schleimabsonderungen, Tränen und der saure pH-Wert von Pathogenen durchbrochen, beginnt der Körper mit der Immunabwehr. Hierbei werden zwei Immunmechanismen unterschieden, die angeborene (unspezifische) und die erworbene (spezifische)

Immunantwort. Etwa 90 % aller Infektionen, denen der menschliche Körper ausgesetzt ist, werden bereits durch die angeborene Immunantwort erkannt und meist erfolgreich bekämpft (MARTINELLI *et al.*, 2005). Alle an einer Immunreaktion beteiligten Zellen entstehen aus blutzellbildenden Stammzellen im Knochenmark. Aus einer lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich die T- und B-Lymphozyten, welche sich später an unterschiedlichen Orten differenzieren. Bei der primären Infektion mit HIV kommt es zur Ausbreitung des Virus im lymphatischen Gewebe. Diese erste Phase der akuten Infektion ist durch eine hohe Viruslast und eine hohe Übertragungswahrscheinlichkeit des Virus charakterisiert. Innerhalb weniger Wochen erfolgt, bedingt durch die Immunantwort des Patienten, eine teilweise Kontrolle der HIV-Replikation und eine von Patient zu Patient unterschiedliche Viruslast stellt sich ein. Die Höhe der Viruslast der Infektion stellt einen maßgeblichen Parameter für den zeitlichen Verlauf der Erkrankung dar. Patienten mit HIV-RNA Kopienzahl unter 10000 Genkopien/ml Blut besitzen eine deutlich längere Überlebenschance, als Patienten mit höheren Virustitern. In der klinischen Latenzphase ist der Patient meist beschwerdefrei, wobei täglich vorwiegend in $CD4^+$ -Lymphozyten (99 %) etwa 10^9 Virionen produziert und durch das Immunsystem wieder eliminiert werden. Gleichzeitig kommt es zur Zerstörung von etwa 5×10^8 - 1×10^9 $CD4^+$ -Zellen täglich. Diese Zahl entspricht in etwa der Anzahl an Zellen, die der Körper pro Tag neu produzieren kann. Insgesamt führt dieser beinahe „steady state“ Zustand in der Regel zu einem langsamen, aber stetigen Abfall der T- Helferzellen, der sich über Jahre hinziehen kann. Das Verhältnis von $CD4^+$ -Zellen zu $CD8^+$ -Zellen (normal: $CD4^+:CD8^+ > 1$) kehrt sich um. Ab einem Schwellenwert von etwa 200 Zellen/ μ l Blut, kommt es zum gehäuften Auftreten von AIDS-typischen opportunistischen Infektionen, mit denen der rasche Zusammenbruch des Immunsystems einhergeht (LEVY, 1993; RINALDO *et al.*, 1995).

Eine unbehandelte HIV-Infektion verläuft in mehreren, unterschiedlich langen Phasen (Abb. 1.9). Innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Primärinfektion kommt es zum starken Anstieg der Viruslast im Blut, der mit dem drastischen Abfall der $CD4^+$ -Helferzellen einhergeht. Hinzukommt die erhöhte Anfälligkeit gegenüber anderen opportunistische Infektionen und Tumoren (WEBER, 2001). Unterhalb eines Schwellenwertes von 2×10^{11} $CD4^+$ -Zellen/ Liter Blut wird bei den Patienten eine Immundefizienz beobachtet.

Nach einer Stationierung der $CD4^+$ -Helferzellzahl, beginnt das Immunsystem erste Antikörper zu bilden. Die erste Immunantwort des Körpers, die von grippeähnlichen Symptomen (z.B. Fieber, Niedergeschlagenheit, Kopfschmerzen, Anschwellen der Lymphknoten) begleitet wird, und dem Auftreten von Antikörpern, fällt die Viruslast nach

vier bis sechs Wochen nach Infektion um mehrere \log_{10} -Stufen ab und bleibt in der Folgezeit teilweise auch Jahre lang stabil.

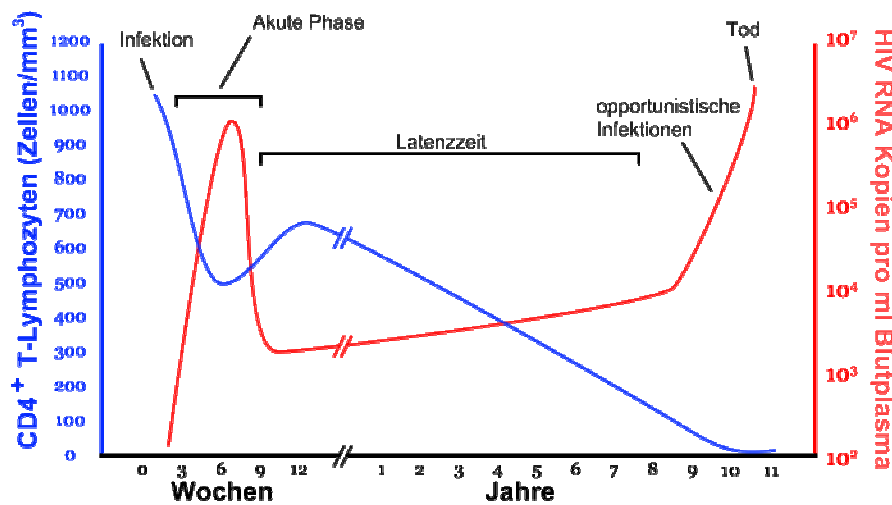


Abb.1.9: Verlauf einer HIV-Infektion ohne Behandlung (IFI, 2010)

Dieser stationäre Zustand wird medizinisch als viraler Setpoint bezeichnet (ALTFELD *et al.*, 2007). Die zweite Phase wird als asymptomatische HIV-Infektion bezeichnet. Im weiteren Verlauf der Erkrankung verringert sich die Zahl der Helferzellen. Trotz hoher Viruslasten, zeigen betroffene Patienten kaum Unwohlsein und die Erkrankung kann Jahre lang unentdeckt bleiben. Allgemeine Krankheitssymptome können andauernde Abgeschlagenheit, vergrößerter Lymphknoten oder ein verändertes Blutbild sein. Die asymptomatische Infektion geht in eine symptomatische, die dritte Phase einer HIV-Infektion über. Der zunehmende Verlust von körpereigenen Abwehrzellen begünstigt die unzureichende Abwehr gegenüber anderen Erregern und kann zur Diagnose AIDS führen.

1.3 Epidemiologie des HI-Virus

Die Ausbreitung des HI-Virus und der Krankheit AIDS ist in den vergangenen 25 Jahren immens vorangeschritten und verursacht weltweit für Millionen von Menschen großes Leid. Nach offiziellen Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und den Vereinten Nationen (UNAIDS) leben heute etwa 33,4 Millionen Menschen mit dem Virus (Stand: 03/2010, WHO, 2010). Seit Beginn der Pandemie sind über 25 Millionen Menschen an den Folgen der im Zusammenhang mit AIDS auftretenden Krankheiten gestorben und knapp 15 Millionen Kinder durch AIDS zu Waisen oder Halbwaisen geworden (Stand: 12/2009, UNAIDS, 2010). Weltweit steigt die Infektionsrate insbesondere unter Frauen stark an, die etwa 50 % der HIV-Infizierten ausmachen. In Mittel-Afrika sind es heute bereits fast 60 %.

Auch in Deutschland sind trotz fortschreitender Entwicklung von Therapeutika die Zahlen der Neuinfektionen konstant. 2009 veröffentlichte das Robert Koch-Institut in seinem Jahresbericht die Zahlen der HIV-Neuinfektionen. Insgesamt infizierten sich im vergangenen Jahr in Deutschland 2856 Menschen mit HIV. Im Gegensatz zum Vorjahr 2008 blieb die Zahl mit 2843 Infizierte damit relativ stabil (RKI, 2010). Allgemein wird jedoch von weit höheren Zahlen ausgegangen, da die Dunkelziffer der Infektionen in der Statistik nicht erfasst wird. Die AIDS-Pandemie lässt sich dabei nicht auf bestimmte Bevölkerungsgruppen beschränken. Während in den Entwicklungsländern das Risiko einer Ansteckung mit dem Erreger HIV auf ungeschützten Sexualkontakt zurückgeht, ist die in Deutschland am häufigsten auftretende Infektionsmöglichkeit (72 %) der Sexualkontakt homosexueller Männer untereinander. Andere mögliche Infektionswege sind in Europa neben dem Konsum von Drogen (8 %), die Übertragung des Virus von der gebärenden Mutter auf ihr Kind (< 1 %).

1.3.1 Therapieansätze

In den letzten Jahren wurden deutliche Fortschritte in der Entwicklung und Anwendung neuer Therapeutika erzielt. Die gleichzeitige Verabreichung von mindestens drei bzw. vier verschiedenen Medikamenten kann bisher das Auftreten resistenter Viren infolge des hohen Selektionsdrucks zwar noch reduzieren, langfristig gesehen stellt diese Resistenzbildung der Viren allerdings ein ernst zu nehmendes Problem dar. Zudem sind die derzeitig verwendeten Therapeutika sehr kostenintensiv (ca. 15000 € pro Patient und Jahr), womit der Einsatz in Entwicklungsländern erschwert wird. Daraus wird ersichtlich, dass die Entwicklung eines prophylaktisch wirksamen und gleichsam kostengünstigen Impfstoffes unverzichtbar ist.

1.3.1.1 Hochaktive Antiretrovirale Therapie (HAART)

Die am weitesten verbreitete Variante der bisher untersuchten Therapiestrategien ist die Kombination von mindestens drei verschiedenen Medikamenten, die sogenannte Hochaktive Antiretrovirale Therapie (DELTA, 1996; HAMMER *et al.*, 1996). Generell werden zwei nukleosidartige Reverse Transkriptase-Hemmer mit Proteasehemmern oder nicht-nukleosidartigen Reverse Transkriptase-Hemmern kombiniert. Problematisch für eine angewandte Kombinationstherapie ist die Resistenzentwicklung gegen verabreichte Medikamente. Da die antiretroviralen Medikamente hochspezifisch wirken, können kleine Veränderungen des HIV zu einer Wirkungsverminderung oder einem Wirkungsverlust der Medikamente führen. Abhilfe in dieser Problematik verspricht der Einsatz von

Fusionshemmern. Deren Anwendung verhindert die Infektion mit HI-Viren durch Blockierung konservierter Bindungsstellen innerhalb des gp41 (Shuwen *et al.*, 2005).

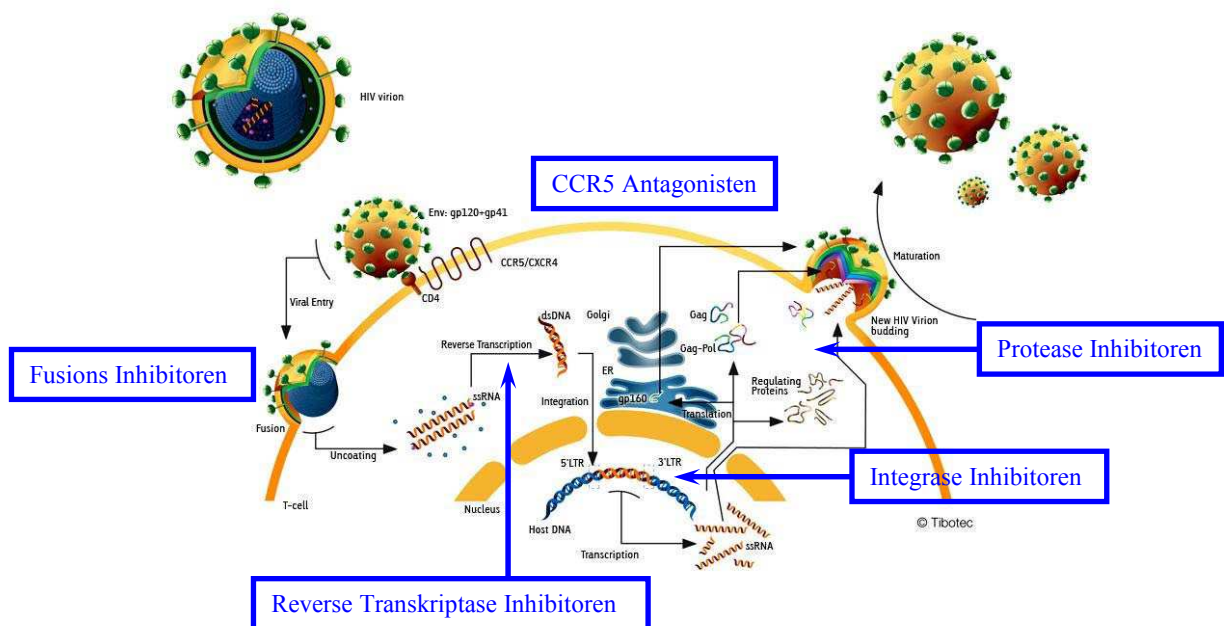


Abb.1.10: Mögliche Angriffspunkte einer HIV-Therapie im Laufe des Infektionszyklus des HI-Virus (nach Tibotec, 2010)

Der Fusionsinhibitor T-20 wurde 2004 für die Therapie vorbehandelter Patienten unter der Bezeichnung Fuzeon (Enfuvirtide) zugelassen (GULICK, 2003; JAMJIAN *et al.*, 2004; MOORE *et al.*, 2003). Therapieerfolge sind von der individuellen Anpassung an den jeweiligen Patienten abhängig (HOFFMANN, 2004; MARCUS *et al.*, 2002).

1.3.1.2 Gentherapie

Als Alternative zur klassischen medikamentenbasierten HIV-Therapie wurden gentherapeutische Ansätze untersucht, welche sich in drei Gruppen untergliedern lassen (BUCHSCHACHER *et al.*, 2001). Zu der ersten Gruppe gehören Strategien, bei denen sogenannte Selbstmördergene in die mit HIV infizierten Zellen eingeschleust werden und diese so durch induzierten Zelltod (Apoptose) eliminieren. Die Expression der eingeschleusten Gene kann dabei durch HIV-Promotoren reguliert werden, so dass sie nur in infizierten Zellen exprimiert werden (VOCERO-AKBANI *et al.*, 1999; VON LAER *et al.*, 2001). Zur zweiten Gruppe gehören Strategien, die auf der Degradierung viraler RNA basieren und damit die Produktion neuer Viruspartikel verhindern. Ansätze der dritten Gruppe beruhen auf der Idee, antiviral wirksame Gene in die HIV-Zielzellen bzw. deren Vorläuferzellen

einzubringen. Dieses Verfahren wird auch als intrazelluläre Immunisierung bezeichnet (VON LAER *et al.*, 2001). Obwohl einige Gentherapieansätze vielversprechende Ergebnisse *in vitro* und in Tierversuchen lieferten, konnten in den bisher durchgeführten klinischen Studien keine Vorteile für die behandelten Patienten nachgewiesen werden (VON LAER *et al.*, 2001; YANG, 2004).

1.3.1.3 Konzeptionierung eines Impfstoffes gegen HIV

Die ersten Impfstoffstrategien gegen HIV basieren auf bereits etablierten Therapieverfahren anderer viraler Erkrankungen. Es werden inaktivierte Viren, lebende attenuierte Viren und rekombinante virale Proteine als Antigene (Abb. 1.11) verwendet. Wie von anderen Impfstoffen bekannt, kann durch die exogene Verabreichung der Antigene auf der Basis klassischer Totimpfstoffe, rekombinanter Antigene, synthetischer Peptide und inaktivierter Viruspräparationen, eine T-Helfer zellabhängige humorale Immunantwort erzeugt werden.

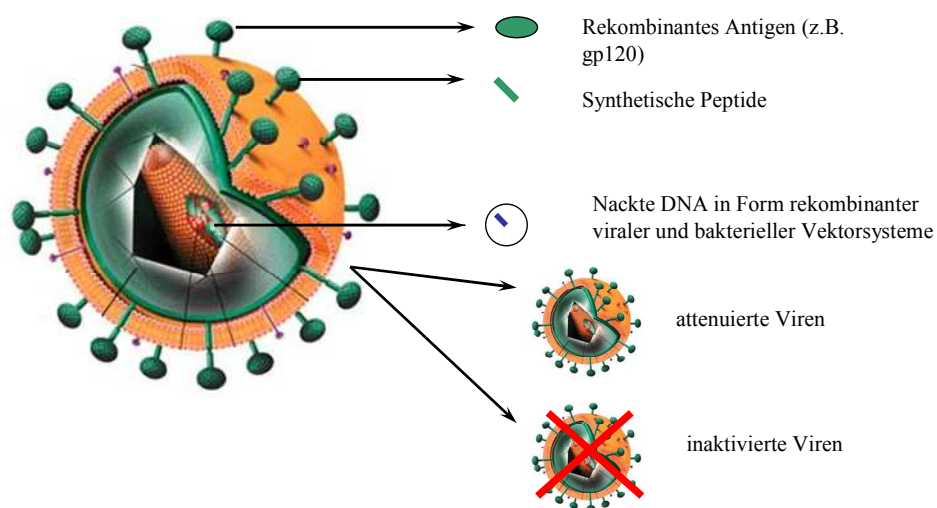


Abb. 1.11: Mögliche HIV-Impfstoffstrategien (nach HOFFMANN, 2004)

1.3.1.3.1 Inaktivierte HIV-Viruspräparate

Problematisch bei Immunisierungen ist der Einsatz von Totimpfstoffen, da eine vollständige Inaktivierung (z.B. durch Lösungsmittel, Detergentien, Chemikalien (Formaldehyd, Methyleneblau) oder Hitze-Inaktivierung) nicht garantiert werden kann, ohne die Immunogenität des eingesetzten Antigens zu schwächen. Ein HI-Viruspartikel, dem die Oberflächenproteine entfernt wurden und bei dem Mutationen in dessen RNA herbeigeführt wurden, dient hier als Antigen. Dieser Ansatz ist allerdings aufgrund der hohen Risiken bei der Herstellung sowie einer geringen Immunogenität nicht viel versprechend (KAHN, 2000; LEVINE *et al.*, 1996).

1.3.1.3.2 Attenuierte HI-Viren

Attenuierte Viren ähneln in ihrem Aufbau, der Proteinzusammensetzung und ihrem Infektionsverhalten Erregern mit krankmachenden Eigenschaften. Im Vergleich zum Wildtyp des Virus verursachen attenuierte Viren hingegen meist nur abgeschwächte Infektionen. Die Proteine, welche in ihrem Verlauf gebildet werden, sind im Idealfall identisch mit denen der virulenten Virusstämme oder zeigen starke Ähnlichkeiten. Durch die Synthese viraler Polypeptide während der abgeschwächten Infektion wird die Bildung neutralisierender Antikörper und zytotoxischer T-Zellen induziert. Die Immunantwort eignet sich daher, um einen langanhaltenden, kompetenten Schutz vor der Infektion mit dem jeweiligen pathogenen Erreger aufzubauen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass sich beispielsweise attenuierte Δnef Viren langfristig rekonstituieren konnten und pathogene Viren entstanden. Beobachtet wurde dies sowohl in neugeborenen und langzeitinfizierten erwachsenen Affen, als auch im Menschen (BABA *et al.*, 1995; BABA *et al.*, 1999). Der Einsatz von attenuierten retroviralen Lebendimpfstoffen im Menschen wird beim derzeitigen Forschungsstand, durch die Gefahr, dass persistierende attenuierte Viren zu pathogenen Varianten revertieren können nicht weiter verfolgt (BUCHBINDER *et al.*, 2008; GILBERT *et al.*, 2005; MCEL RATH *et al.*, 2008; RERKS-NGARM *et al.*, 2009).

1.3.1.3.3 gp41 und andere rekombinante Proteine als Antigene

Die Entwicklung von Impfstoffen auf der Basis rekombinanter viraler Proteine wird seit den frühesten Erkenntnissen über die Erreger und deren immunologisch wichtigen Strukturen untersucht. Durch das Wissen über den Mechanismus der Immunantwort gegenüber viralen Oberflächenproteinen, kann die Synthese des Polypeptides in eukaryontische Expressionssysteme übertragen, gereinigt und anschließend zusammen mit einem Adjuvans verabreicht werden. Der erzielte Impfschutz korreliert hierbei mit der Induktion Virus-neutralisierender Antikörper. Bisher wurden für die Produktion eines HIV-Impfstoffes die Glykoproteine gp160, gp120 und gp41 in Bakterien, Hefe und Säugerzellen produziert und in verschiedenen Tiermodellen getestet. Die rekombinanten Antigene waren gut verträglich und immunogen und ließen den Nachweis neutralisierender Antikörper zu. Gegenüber primären HIV-Isolaten zeigten diese Seren jedoch keine neutralisierende Wirkung (COHEN, 1993; MASCOLA *et al.*, 1996). Bei Teilnehmern an einer rekombinanten gp120-Studie konnte kein positiver Effekt bezüglich der Infektion oder dem klinischen Verlauf der Infektion aufgrund der Verabreichung von rekombinantem gp120 beobachtet werden (BALL *et al.*, 1998). Neuere Ansätze versuchen, *Env* Immunogene zu verwenden, die sich näher an der nativen und

oligomeren Struktur des Oberproteins befinden (oligomeres gp140 (EARL *et al.*, 2001), durch Disulfidbrücken stabilisiertes oder an Rezeptoren gekoppeltes oligomeres gp120 (FARZAN *et al.*, 1998; KWONG *et al.*, 1998)). Aber auch das nicht kovalent an gp120 gebundene Glykoprotein gp41 wird als Antigen untersucht. Rekombinantes gp41 wird erfolgreich als Antigen im Tiermodell getestet.

1.3.1.3.4 Einsatz synthetischer Peptide

Peptidimpfstoffe bestehen aus synthetischen Peptiden mit einer Länge von 15 bis 30 Aminosäuren. Der Vorteil dieser Impfstoffe besteht in dem völligen Ausschluss von Kontaminationsrisiken, sowie der selektiven Verwendung immunologisch bedeutsamer und gut charakterisierter Epitope (BOLOGNESI, 1989; PALKER *et al.*, 1989). Durch die Verabreichung von Peptiden konnte die Bildung isolatspezifisch neutralisierender Antikörper induziert werden, die gegen kontinuierliche Epitope gerichtet sind. Ein Hauptproblem in der Verwendung synthetischer Peptide liegt in der geringen Immunogenität. Durch die kombinierte Verabreichung von Adjuvantien oder Quervernetzung der synthetischen Peptide zu verzweigten Multiepitop-Peptiden konnte die Antikörperantwort gesteigert werden (TRIPATHY *et al.*, 1992).

1.3.1.3.5 Rekombinante Vektorsysteme

Impfviren, die ihre pathogene Eigenschaft verloren haben - meist Pockenviren - werden genetisch verändert, sodass sie außer für ihre eigenen zur Infektion und Replikation benötigte Genprodukte, auch die anderer Viren codieren. Diese für das Virus unspezifischen Fremdgene werden nach der Inokulation im Verlauf der Infektion im Organismus zusammen mit den anderen Genen exprimiert. Mit diesem System konnte in einer Reihe von Tiermodellen ein Impfschutz gegen virale Infektionen gefunden werden (MOSS *et al.*, 1984; PAOLETTI *et al.*, 1984; SMITH *et al.*, 1983; WIKTOR *et al.*, 1984; WIKTOR *et al.*, 1992). Dabei konnten starke humorale und zellvermittelte Immunantworten induziert werden. Auch die Effektivität von HIV-Genen exprimierenden, rekombinanten adenoviralen Vektoren wurde im Rhesus-Makaken- (BUGE *et al.*, 1997; BUGE *et al.*, 1999) und Schimpansenmodell (LUBECK *et al.*, 1994) getestet. Während generell erhöhte humorale und zellvermittelte Immunantwort induziert werden konnten, konnte im Makakenmodell nur ein partieller Schutz erzielt werden. Ein weiterer Vorteil der rekombinanten Lebendviren ist, dass sie effektive Stimulatoren des immunologischen Gedächtnisses sind. Auch viele Jahre nach einer Immunisierung konnten noch antigenspezifische CD4⁺- und CD8⁺-Gedächtniszellen *in vivo* nachgewiesen werden

(DEMKOWICZ *et al.*, 1996). Doch ob die induzierten Immunantworten ausreichenden Schutz vor einer mukosalen HIV-Infektion liefern, werden weitere Studien im Primatenmodell zeigen.

1.3.1.3.6 Rekombinante DNA-Impfstoffe

Die Immunisierung mit „nackter“ DNA bietet die Möglichkeit, sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunantwort zu induzieren (ULMER *et al.*, 1993). Insbesondere das Vorkommen von unmethylierten CpG-Dinukleotiden in einem besonderen Basenkontext (CpG-Motiv) innerhalb bakterieller DNA bewirkt eine direkte Stimulation von B-, T- und natürlichen Killerzellen (BALLAS *et al.*, 1996; KRIEG *et al.*, 1995; STACEY *et al.*, 1996) und trägt auf Grund freigesetzter Zytokine (IL-6, IL-12 und INF- γ) zur gesteigerten Immunogenität der DNA-Vakzine bei (KLINMAN *et al.*, 1996). Darüber hinaus werden die DNA je nach Applikationsform von Muskel- oder Epithelzellen aufgenommen und die Plasmid-kodierten Gensequenzen exprimiert (HENGGE *et al.*, 1996; SATO *et al.*, 1996; WOLFF *et al.*, 1990). In Mäusen zeigte sich darauf hin eine lebenslange Persistenz und Expression der Fremd-DNA, ohne dass eine Replikation oder Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Wirtszelle erfolgte (FYNAN *et al.*, 1993; TANG *et al.*, 1992; WOLFF *et al.*, 1991) wodurch langfristig effiziente humorale und zellvermittelte Immunantwort gegen das HIV-1 Hüllprotein gp160 (WANG *et al.*, 1993) und gp120 (FULLER *et al.*, 1994; LU *et al.*, 1995) nachgewiesen werden konnten. Die DNA-Impfung stellt einen innovativen Ansatz zur Entwicklung eines HIV-Vakzinekandidaten dar.

1.4 Immunisierung mit transmembranen Proteinen von Retroviren.

Ergebnisse der Arbeitsgruppe Denner

Bei der Generierung von Impfstoffen gegen HIV und weitere Retroviren wurden Strategien verfolgt, welche auf der Induktion breit und spezifisch neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV bzw. p15E der Gammaretroviren basierten. Im Vergleich zum sehr variablen Protein gp120 enthält gp41 hoch konservative Domänen, wichtige Bereiche für die Infektiosität des Virus. Auf Grund des Wissens um die breit neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 wurde die Herstellung spezifischer Antigene angestrebt (FIEBIG *et al.*, 2005). Diese Antigene sollten neutralisierende Antikörper induzieren und im Tiermodell getestet werden. Den Versuchen zur Gewinnung neutralisierender Antikörper gegen HIV gingen erfolgreiche Versuche zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen andere Retroviren (Porcines endogenes Retrovirus (PERV), Felines

Leukämievirus (FeLV), Koala Retrovirus (KoRV)) voraus (FIEBIG *et al.*, 2003; FIEBIG *et al.*, 2006; LANGHAMMER *et al.*, 2005a; LANGHAMMER *et al.*, 2005b). Bei diesen Immunisierungen wurden zwei Epitope gefunden, E1, das sich in der Fusionspeptid-proximalen Region (FPPR) von p15E und E2, das im MPER liegt (FIEBIG *et al.*, 2003). Die Induktion dieser neutralisierenden Antikörper könnte Grundstein für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen PERV sein. Ähnliche Epitope wurden bei der Immunisierung mit p15E von FeLV und KoRV gefunden (LANGHAMMER *et al.*, 2005a; LANGHAMMER *et al.*, 2005b; nicht publizierte Daten). Die Epitope im MPER von p15E sind nicht nur ähnlich lokalisiert wie die Epitope der Antikörper 2F5 und 4E10, sondern es wurden auch Sequenzhomologien beschrieben. Das zeigt dass die MPER ein susceptibles Target für neutralisierende Antikörper bei allen Retroviren ist. Desweiteren wurde eine bessere Immunisierung nach Applikation des p15E von FeLV und dessen Oberflächenhüllprotein beschrieben (LANGHAMMER *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass diese Epitope auch bei HIV vorliegen. Weiterhin konnte im Verlauf der Untersuchungen erstmals bewiesen werden, dass im transmembranen Hüllprotein gp41 von HIV-1 eine E1-Domäne vorhanden ist, die die Bindung von 2F5 und 4E10 an ihre Epitope erhöhte (FIEBIG *et al.*, 2010). Die transmembranen Hüllproteine enthalten eine immunsuppressive Domäne, die hochkonserviert ist. Synthetische Peptide, die dieser Domäne entsprechen, sowie virale transmembrane Hüllproteine wie p15E und gp41 hemmen die Lymphozytenproliferation, modulieren die Zytokinexpression und verändern die Genexpression in behandelten PBMC's (Übersicht siehe DENNER, 2000; DENNER, 2010; DENNER *et al.*, 1994; DENNER *et al.*, 1996; DENNER, 1998; TACKE *et al.*, 2000). Durch gezielte Mutationen der ISU-Domäne, wird derzeit deren Einfluss auf die Bildung neutralisierender Antikörper untersucht.

1.5 Zielsetzung

Nach mehr als 25 Jahren intensiver Forschung ist es bisher nicht gelungen einen Impfstoff zu entwickeln, der die Übertragung von HIV und damit die Entwicklung von AIDS verhindert. Alle Ansätze zur Herstellung eines HIV-Impfstoffes auf Basis des Oberflächenhüllproteins gp120 scheiterten auf Grund seiner komplexen Struktur und Variabilität. Die Fokussierung auf das weniger stark glykosylierte und stärker konservierte transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 ermöglichte die Identifizierung von Epitopen, die durch breit neutralisierende Antikörper in der membranproximalen externen Region (MPER) des Proteins detektiert wurden. Da das transmembrane gp41 direkt an der Fusion der Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle beteiligt ist, stellt es ein effektives Ziel für die Impfstoffentwicklung

dar. Zwei breit neutralisierende Antikörper, 2F5 und 4E10, wurden von HIV-1-Infizierten isoliert. Sie sind breit neutralisierend und gegen die membranproximale externe Region (MPER) des gp41 gerichtet. Auf Grund der komplexen und nicht vollständig geklärten Wirkmechanismen dieser Antikörper ist es bis heute nicht gelungen, Antikörper mit vergleichbaren Eigenschaften durch Immunisierungen zu gewinnen. Da die Faltung und Glykosylierung des rgp41 sicher einen entscheidenden Einfluss auf die resultierende Immunantwort hat, soll hier rekombinantes gp41 in humanen Zellen hergestellt werden. Dazu sollen Ratten mit diesem rgp41 immunisiert werden. Es soll nachgewiesen werden, welche Immunantwort durch rgp41 hervorgerufen wird. Die Analyse der gewonnenen Seren soll Aufschluss darüber geben, ob neutralisierende Antikörper gebildet werden. Desweiteren steht die Etablierung einer permanent gp41 exprimierenden Zelllinie in humanen Lymphozyten in FKS-freiem Medium im Vordergrund. Rekombinantes gp41 soll in großen Mengen produziert werden, um Immunisierungsstrategien im großen Maßstab und in hohen Dosierungen zu realisieren. Mit verschiedenen, mutierten Expressionskonstrukten soll der Einfluss der immunsuppressiven Eigenschaften des rgp41 und die Produktivität der einzelnen Konstrukte analysiert werden. Anhand verschiedener Analyseverfahren, einschließlich einer Immunofluoreszenzanalyse soll abschließend untersucht werden, inwieweit die Expression des rgp41 in den selektierten Zelllinien optimiert werden konnte.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

ABI	
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG
ROTI [®] GAROSE f.d. DNA/RNA Elektrophorese	
Amersham [™] ECL [™] Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG
5-Azacytidin	
Big Dye	
BDIP	
Bovine Serum Albumin (BSA V)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG
Complete/ Incomplete Freund's Adjuvant	
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG
EDTA	
Essigsäure/ Eisessig	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Geneticin (G-418)	
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
200 mM, low endotoxin	
Glycine	Merck
Fötales Kälberserum/ Fetal Bovine Sera (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Mycoplasma and endotoxin free	
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG
IPTG	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumhexacyanidoferrat (II)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumhexacyanidoferrat (III)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Lifor	
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
MP Diagnostics Western Blot	MP Diagnostics
BUF WASH 20x, LAX 0511-0	
MP Diagnostics Western Blot,	MP Diagnostics
SUBS, BCIP/ NBT	
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG
NBT	
Non-essential amino acids solution	Sigma/ MEM
100x, endotoxin free	
Novex 4-20 % Tris-Glycine Gel	Invitrogen
1,0 mm x 12 Wells	

Novex® Tris-Glycine Native Running Buffer (10x)	Invitrogen
Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x)	Invitrogen
NP-40	
o-Phenylenediamine dihydrochloride-Tablette (30 mg)	Sigma
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	hausintern zubereitet
Pierce ECL Western Blotting Substrate	
PFA	
Poly-Lysin	
Ponceau S	Sigma Aldrich
Streptomycin/ Penicillin	GIBCO
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	
Sucrose	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sucofin Magermilchpulver	Zeven
TransIT-293 Transfection Reagent	MIRUS Cooperation
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %)	
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG
Wasserstoffperoxid	Merck
X-Gal	

2.1.2 Geräte

Ampere Chart Multitron II Schüttler	Infors AG
CURIX60 LC 50 Hz	Agfa
Modell-Nr.: 9462_2257	
Inkubator	Heraeus/ Willi Fischer KG
	Laboratoriumsbedarf
	Frankf./Main, Thermo Electron
	Corporation
	BIORAD
GELDOC	
MxPro - Mx3000P	
Nano Drop® Spectrophotometer ND-1000	peqLab Biotechnologie GmbH
TECAN Spectra Classic Plate Reader	Tecan
Vakuumpumpe Typ 4EKG63DX-4	ABM Greiffenberger Antriebs-
	technik GmbH Marktrechwitz
X Cell Sure Lock™	VWR/ Roth
Zentrifuge Typ 5415D	Eppendorf

2.1.3 Hilfsmittel

CL-XPosure™ Film	Thermo Scientific
Clear Blue X-Ray Film (light sensitive), 5x 7 inches	
JPT Epitope membrane	JPT Peptide Technologies
	GmbH
	Schleicher & Schuell BA083
Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	
PVDF-Membran	
Roti®-Spin MINI 10-Säule/ Zentrifugenröhrchen (Δ10)	
Spritzen Inkjet Luer Solo	B/BRAUN
2 ml/10 ml, steril, nonpyrogenic	
Sterilfilter 0,2 µm/ 0,45 µm	Whatman® Schleicher &
Gebrauchsfertige Filterinheit, Rotrand, Cellulose-	Schuell

acetat steril	
Thinwall Polyallomer Tubes 5 ml, 13x 51 mm	Beckman Coulter
Zellkulturtestplatte 6F/ 12F/ 24F/ 96F Zellkulturbehandelt, gammasterilisiert, pyrogenfrei, RNA-/DNA-frei, RNase-/DNase-frei	TPP®
Zellkulturflaschen 20 cm ² / 75 cm ² Schraubverschluss mit Filter, Zellkulturbehandelt, gammasterilisiert, pyrogenfrei, RNA-/DNA-frei, RNase-/DNase-frei	TPP®
Zellkulturschalen Ø 100x 20 mm/ Ø 150x 20 mm Zellkulturbehandelt, gammasterilisiert, pyrogenfrei, RNA-/DNA-frei, RNase-/DNase-frei	TPP®

2.1.4 Kits

DNeasy® Blodd & Tissue Kit (250)	QIAGEN
MiraCLEAN® Endotoxin Removal Kit	Mirus Corporation
Compact Prep Midi Core Kit (100)	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Quik Change® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene/ Agilent Technologies
Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System	Promega Corporation
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega Corporation
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research.com

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellen

HEK-293T:

In der Zellkultur wurde die Zelllinie HEK-293T, *Human Embryonic Kidney*-Zellen, also menschliche embryonale Nierenzellen, verwendet. Sie sind bei der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas (USA) unter der folgenden Nummer gelistet: CRL-1573™.

TZM-bl:

Zur Untersuchung von Neutralisationen wurde die Zelllinie TZM-bl des NHI AIDS Research & Reference Reagent Program verwendet.

Bei den TZM-bl Zellen handelt es sich um modifizierte, transgene HeLa-Zellen (Henrietta Lax). Sie dienen der Sichtbarmachung wirkender HIV-Infektionen *in vitro* und ermöglichen es Bindungsprozesse von Antikörpern oder Inhibitoren besser zu untersuchen. Die Zellen tragen verschiedene Kaskaden, die die Ausbildung von spezifischen Chemokinrezeptoren, CD4 und viraler Proteine ermöglichen. CD4 ist

unter normalen Bedingungen nur bei T-Helferzellen und bestimmten T-Lymphozyten vorzufinden. CD4 dient dem Virus zum Andocken an die Wirtszelle.

2.2.2 Zellkulturmedien

CHO: CD CHO Medium wurde von Invitrogen [GIBCO] als Fertigmedium bezogen und ist für die Expression rekombinanter Proteine in Suspensionszellen optimiert.

<i>DMEM:</i>	500 ml	DMEM (hausintern zubereitet)
	50 ml	Fetal Bovine Serum (FKS)
	5 ml	L-Glutamin 200mM
	5 ml	non-essential amino acid solution 100x
	3 ml	Streptomycin/ Penicillin

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besteht aus einer Vielzahl anorganischer Salze, Aminosäuren und Vitaminen, das durch D-Glucose, Phenolrot und Natriumpyruvat vervollständigt wurde. Autoklaviert wurde das Medium bei 120°C für 30 Minuten und anschließend bei 4°C gelagert.

OptiPROTM SFM: Serum freies Medium ohne L-Glutamin [GIBCO].

Ex-CellTM EBx[®] PRO-I: Serum freies Medium für die Kultivierung embryonaler Stammzellen. Es enthält L-Glutamin und Phenolrot als pH-Stabilisator. Bezogen wurde das Medium von SAFCBIOSCIENCETM.

293SFM II: Serum freies Medium [GIBCO] welches für die Kultivierung von Zellen in Suspension optimiert ist.

2.2.3 Kultivierung der Zellen in Medium mit Fötalem Kälberserum (FKS)

Standard gemäß wurden die Zellen in DMEM kultiviert. Hierfür wurde 1 ml einer Ausgangszellsuspension der vorangegangenen Passage in 12 ml frisches Medium überführt. Die Zellen wurden dreimal mit einer 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen und im dritten Waschschrift, die abgelösten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche aufgenommen. Die Zellen wurden 2 bis 3 Tage bei 37°C, 5 % CO₂ und einer Raumluftfeuchte von 80 % inkubiert.

<i>Trypsin-EDTA-Lösung:</i>	1000 ml	Hanks' B.S.S.
	0,5 g	Trypsin (1:250)

0,2 g EDTA x 4Na

2.2.4 Herstellung von Gefrierkulturen

Für die Herstellung von Gefrierkulturen wurden 293T- bzw. TZM-bl-Zellen durch dreimaliges Waschen mit 3 ml einer 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung aus einer Zellkulturflasche entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden darin bei 2000 rpm für 6 Minuten pelletiert und anschließend mit DMEM durch Resuspendieren des Pellets und wiederholter Zentrifugation, gewaschen. Zur Aufbewahrung der Zellen bei -80°C wurde das Pellet in 3 ml Gefriermedium resuspendiert und in Cryoröhrchen bei -80°C über mehrere Jahre gelagert.

Trypsin-EDTA-Lösung

<i>Gefriermedium:</i>	5 ml	DMEM
	4 ml	Fötales Kälberserum (FKS)
	1 ml	Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.2.5 Selektion von 293T-Zellen in Medium ohne FKS

Für die Selektion von 293T-Zellen zur Kultivierung in Serum freiem Medium wurden folgende Medien wie in Tabelle 2.1 aufgeführt kombiniert. Jedes Selektionsmedium wurde mit Glutamin (1:100), nicht-essentiellen Aminosäuren (1:100), Penicillin/ Streptomycin (1:200) und Natriumpyruvat (1:100) vervollständigt. Die Zellen wurden aus DMEM entnommen und in Selektionsmedium überführt, für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 12 ml Selektionsmedium resuspendiert und auf zweimal 6 ml aufgeteilt. Der Ansatz wurde erneut für 3 Minuten bei 1000 rpm pelletiert und das verbliebene Pellet wiederum in Selektionsmedium resuspendiert. Je 25 µl/ Well dieser Zellsuspension wurden nun auf eine 24-Wellplatte aufgeteilt und für 48 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und 80 % Raumluftfeuchte inkubiert. Die Beobachtung der Zellmorphologie erfolgte über einen Zeitraum von 3 bis 4 Monaten und wurde durch regelmäßigen Mediumwechsel alle 1 bis 2 Tage unterbrochen.

Tab. 2.1: Kombinationsvarianten von Serum-freiem Medium für die Selektion von 293T-Zellen

Konz.	Medium A	Konz.	Medium B
100%	DMEM		
90%	DMEM	10%	CHO
70%	DMEM	30%	CHO
50%	DMEM	50%	CHO
30%	DMEM	70%	CHO
10%	DMEM	90%	CHO
90%	DMEM	10%	Opti
70%	DMEM	30%	Opti
50%	DMEM	50%	Opti
30%	DMEM	70%	Opti
10%	DMEM	90%	Opti
90%	DMEM	10%	293 SFM
70%	DMEM	30%	293 SFM
50%	DMEM	50%	293 SFM
30%	DMEM	70%	293 SFM
10%	DMEM	90%	293 SFM
100%	DMEM _{ΔFKS}		
90%	DMEM _{ΔFKS}	10%	CHO
30%	DMEM _{ΔFKS}	70%	CHO
90%	DMEM _{ΔFKS}	10%	Opti
70%	DMEM _{ΔFKS}	30%	Opti
50%	DMEM _{ΔFKS}	50%	Opti
30%	DMEM _{ΔFKS}	70%	Opti
10%	DMEM _{ΔFKS}	90%	Opti
100%	DMEM _{complete}		
50%	DMEM _{complete}	50%	CHO
10%	DMEM _{complete}	90%	CHO
100%	CHO		
90%	CHO	10%	Opti
70%	CHO	30%	Opti
50%	CHO	50%	Opti
30%	CHO	70%	Opti
10%	CHO	90%	Opti
90%	CHO	10%	293 SFM
70%	CHO	30%	293 SFM
50%	CHO	50%	293 SFM
30%	CHO	70%	293 SFM
10%	CHO	90%	293 SFM
100%	Opti		
50%	Opti	50%	PRO-I
90%	Opti	10%	293 SFM
70%	Opti	30%	293 SFM
50%	Opti	50%	293 SFM
30%	Opti	70%	293 SFM
10%	Opti	90%	293 SFM
100%	PRO-I		
100%	293 SFM		

2.2.6 Selektion transfizierter 293T-Zellen mittels dem Einsatz von Filtern

293T-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte in DMEM mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikas Geneticin (G-418; 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml) kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bzw. nach Ausbilden eines Monolayers wurden die Zellen in 12 ml DMEM mit der entsprechenden Konzentration Geneticin aufgenommen, in eine Petrischale überführt und üN bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe eines am Schalenboden aufgezeichneten Gitternetzes konnten Zellklone identifiziert und abgenommen werden. Abgenommen wurden die ausgewählten Zellen mit einem in einer 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung durchfeuchteten Filterplättchen. Unter Zuhilfenahme einer Pinzette wurde das Filterplättchen aus der Trypsin-EDTA-Lösung entnommen und für einige Minuten auf die identifizierten Zellen gelegt. Diese Art der Kultivierung neuer Klone transfizierter Zellen wurde konsequent durch alle Konzentrationen an Geneticin bzw. der verschiedenen Vektorsysteme fortgeführt, so dass 60 Klonen erzielt wurden.

2.2.7 Transfektion von Plasmid-DNA

Zur Transfektion von Plasmid-DNA wurden 293T-Zellen 24 Stunden in einer 6-Well-Platte in DMEM üN bei 37°C, 5 % CO₂ und einer Raumlufffeuchte von 80 % inkubiert. Nach Ausbildung eines einheitlichen Monolayers wurden die Zellen zweimal mit DMEM gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit Opti PROTM SFM-Medium, mit 10 % Lifer (als FKS und Serumersatz) und L-Glutamin (1:100) versetzt und für 10 bis 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Transfektion wurde folgender Ansatz pro Well angesetzt:

200 µl	DMEM
4 µl/µg	TransIT [®] -293 Transfection Reagent

Die Transfektionslösung wurde für 10 bis 15 Minuten bei RT inkubiert und mit 3 µg Plasmid-DNA pro 10⁶ Zellen versetzt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei RT wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Für 48 Stunden wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

Trypsin-EDTA-Lösung

2.2.8 Analyse der Proteine in transfizierten Zellen

Zur Isolierung von Proteinen oder genomischer DNA aus transfizierten 293T-Zellen bzw. deren Medienüberständen wurden drei verschiedene Methoden angewandt.

2.2.8.1 Gewinnung von Proteinen aus Zelllysaten

Phosphatgepufferte Salzlösung PBS:

140,0 mM	Natriumchlorid (NaCl)
2,7 mM	Kaliumchlorid (KCl)
10,0 mM	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat (Na_2HPO_4)
1,8 mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
7,4	pH-Wert

Der PBS-Puffer wurde hausintern hergestellt und konnte über mehrere Monate bei RT gelagert werden.

<i>NP-40 Zelllysispuffer:</i>	50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150 mM	Natriumchlorid (NaCl)
	5 mM	EDTA
	1 %	NP-40

48 Stunden nach Ansatz der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen. Probeweise wurde der Überstand aufkonzentriert (Kapitel 2.2.7.2). Die Zellen wurden mit einer Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) dreimal gewaschen. Beim dritten Waschschrift wurden die Zellen in PBS zu 1/3 in neues DMEM überführt bzw. die restlichen 2/3 in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 2000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde erneut zwei- bis dreimal in PBS gewaschen. Abhängig von der Menge pelletierter Zellen wurden 100 µl NP-40 Zelllysispuffer auf 10^6 Zellen gegeben und diese für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend, nach Ende der Inkubationszeit, für 3 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand als Lysat für weitere Versuche bereitgestellt werden.

2.2.8.2 Aufreinigung der Überstände transfizierter Zellen

48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen und exprimiertes und in Medium abgegebenes gp41 aufkonzentriert. Zur Abtrennung toter Zellen oder zur Eliminierung vorhandener Zellbruchstücke im Medium wurde der Überstand für 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Auf kleinere Reaktionsgefäße aufgeteilt wurde der vorstichtig entnommene Überstand für 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mittels eines 0,45 µm Sterilfilters in Reaktionsgefäße überführt. Der filtrierte

Überstand wurde weiterhin in Vivaspin Zentrifugalröhrchen bzw. mit Hilfe einer Roti[®]-Spin MINI 10-Säule in mehreren Zentrifugationsschritten aufkonzentriert.

2.2.8.3 Extraktion genomischer DNA

Für die Extraktion der DNA wurde das DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (250) der Firma QIAGEN GmbH verwendet. Die DNA bereitgestellter Zellpellets wurde nach Herstellerangaben extrahiert.

1. Zellpellet (optimal 5×10^6 Zellen) in 200 µl PBS resuspendiert
2. Zugabe von 20 µl Proteinase K
3. Zugabe von 200 µl Lysispuffer (AL) und vortexen des Reaktionsgefäßes zum Durchmischen der Reaktionsvolumina, Inkubation für 10 Minuten bei 56°C
4. Zugabe von 200 µl 99 %igem Ethanol und Durchmischen der Reaktionsvolumina durch vortexen
5. Überführen der erhaltenen Lösung in ein im Kit mitgeliefertes DNeasy Mini Spin Röhrchen und Zentrifugation für 60 Sekunden bei 8000 rpm
6. Überführung des DNeasy Mini Spin Röhrchens in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß und
7. Beladen der Säulenmembran mit 500 µl Waschpuffer 1 (AW1), erneute Zentrifugation für 60 Sekunden bei 8000 rpm
8. wiederum Überführen des DNeasy Mini Spin Röhrchens in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß und erneutes Beladen der Säulenmembran mit 500 µl Waschpuffer 2 (AW2), zentrifugieren der Säule für 3 Minuten bei 14000 rpm
9. DNeasy Mini Spin Röhrchen in neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und Säulenmembran mit 200 µl Elutionspuffer (AE) beladen
10. nach einer Inkubation von 5 Minuten bei RT wurde Säulenröhrchen für 60 Sekunden bei 8000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss aufgefangen

Konzentration und Reinheit der extrahierten genomischen DNA wurde mittels des Nano Drop[®] Spectrophotometers ND-1000 gemessen.

2.2.9 SDS-PAGE der Zelllysate und exprimierter Proteine

Für die Elektrophorese präparierter Lysate im nativen Gel wurde die X Cell Sure Lock[™] Gelkammer [Roth] verwendet. Der Probenauftrag erfolgte in einem 4 - 20 % Tris-Glycin Gel (1,0 mm x 12 Well). Die Zelllysate wurden 1:1 mit SDS/TRIS-Glycin-Laufpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 95°C inkubiert und aufgetragen. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteinfragmente wurde ein kommerzieller, vorgefärbter Größenstandard PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder verwendet. Das Gel lief bei einer Spannung von 150 V für 60 bis 90 Minuten.

2.2.10 Western Blot-Detektion

PAGE-Transferpuffer:

3,0 g	Tris
15,0 g	Glycine
800 ml	destilliertes Wasser
200 ml	Methanol

Für den Puffer wurden 3,0 g Tris und 15,0 g Glycine auf 800 ml destilliertes Wasser eingewogen und nach sorgfältigem Mischen, die Lösung mit 200 ml Methanol versetzt. Bei 4°C kann der Puffer über mehrere Monate gelagert werden.

2 % Ponceau Red-Färbelösung:

2 g/l	Ponceau S
100 ml	1 % Essigsäure

Für die Färbelösung wurden 20 g/l Ponceau S auf 1000 ml 1 % Essigsäure eingewogen und nach sorgfältigem Durchmischen und Auflösen des Ponceaupulvers mit einem Filterpapier in ein geeignetes Gefäß filtriert. Die Färbelösung kann so zubereitet über mehrere Monate bei RT aufbewahrt und eingesetzt werden.

Die Übertragung der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine erfolgte im Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe einer Transferkammer. Die Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine erfolgte bei einer Spannung von 48 V für 90 bis 120 Minuten unter Verwendung eines PAGE-Transferpuffers in einer Transferkammer. Zur Sichtbarmachung aufgetrennter Proteine im Gel wurde die Membran mit einer 2 % Ponceau Red-Färbelösung angefärbt. Die Membran wurde durch mehrmaliges Waschen in PBS-Puffer entfärbt und in einer 6 % Magermilchlösung blockiert. Im weiteren Verlauf wurde die blockierte Membran mit dem primären Antikörper oder einem primären Serum in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:1000 für mindestens 4 Stunden inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch fünfmaliges Waschen (je 5 Minuten) bei RT mit PBS + Tween 20 (0,1 % Tween 20) von der Membran entfernt. Die Inkubation mit einem zweiten, für den Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörper wurde für 1 Stunde bei RT in einer Verdünnung von 1:3000 bis 1:10000 durchgeführt.

2.2.11 Immunfluoreszenzanalyse

Die Immunfluoreszenzanalyse ermöglicht die spezifische Detektion der rgp41 Expression auf der Oberfläche und im Inneren von transfizierten, selektierten Zellen. Dazu werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper verwendet, die proteinspezifisch binden. Durch

den Einsatz von genau auf den Farbstoff abgestimmten Filtern konnten interferierende Wellenlängen ausgeblendet werden.

Die adhärent wachsenden Epithelzellen HEK-293T wurden auf mit Poly-Lysin präparierten Deckgläschen ausgesät und üN bei 37°C kultiviert. Die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gewaschen und in 2 % PFA fixiert. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei RT wurden die Zellen erneut für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren wurden sie erst mit einer Lösung aus 0,5 % Triton X-100 für 2 bis 10 Minuten versetzt und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für 30 min bei RT oder üN bei 4°C der Blockpuffer A auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation im Blockpuffer A wurde dieser wieder vorsichtig von den Zellen abgenommen und durch eine Glycinlösung ersetzt. Nach einer Inkubation von circa 1 Stunde bei RT wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS + Triton X-100 gewaschen. Der Zweitantikörper Alexa 488 wurde im gleichen Verhältnis wie 2F5 auf die Zellen gegeben. Wieder wurden die Zellen dreimal mit PBS + Triton X-100 und abschließend einmal mit reinem PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Klarlack auf dem Objektträger fixiert. Eine Auswertung der Expressionsausbeute erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop.

Blockpuffer A

2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.3.1 Bakterien

Max Efficiency[®] DH5 α [™] Competent Cells [Invitrogen]:

Escherichia coli ist ein verhältnismäßig langsam wachsendes Bakterium dieser Gattung, welches aber bei der Transformation hohe Effizienzen erzielt.

Z-Competent[™] *Escherichia coli*-JM109 [Zymo Research]:

Hierbei handelt es sich um chemisch Z-kompetente *E. coli*-Bakterien, die eine einfache und hoch effiziente Transformation garantieren.

One Shot[®] Top10F' *Escherichia coli* Competent Cells [Invitrogen]:

Diese Zelllinie trägt *lacIq* und benötigt Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) um die Expression des *LacZ*-Promotors zu induzieren. Durch diese Eigenschaft werden die Zellen bei der Blau-Weiß-Selektion verwendet.

Top10 F' [Invitrogen]:

Bei Top10 F' handelt es sich ebenfalls um einen Stamm von *Escherichia coli*.

XL10-Gold® Ultracompetent Cells [Stratagene]:

Bei XL10-Gold® handelt es sich um einen hoch effizienten und ultra-kompetenten *Escherichia coli*-Stamm.

2.3.2 Medien zur Kultivierung von Bakterien

<i>LB-Medium:</i>	10 g/l	Casein
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	Natriumchlorid
	2 g/l	inerte Reagenzien (Tablette)

Zur Herstellung von LB-Medium zur Bakterienanzucht wurde ein Trockenpräparat (Tablette) der Firma Sigma Aldrich verwendet. In 1000 ml Flüssigmedium wurden 10 Tabletten gelöst und bei 120°C für 30 Minuten autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedium wurden diesem Ansatz 15 g Agar zugesetzt und dieser ebenfalls unter den genannten Bedingungen autoklaviert. Für die Kultivierung resistenter Bakterienkulturen wurde das Medium wahlweise mit Ampicillin (100 µg/µl) versetzt. Für die Analyse der Blau-Weiß-Selektion wurde Nährmedien mit IPTG (100 mM) und X-Gal (50 µg/ml) bestrichen.

<i>NZYM-Medium:</i>	2 g/l	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
	10 g/l	Casein
	5 g/l	Natriumchlorid
	5 g/l	Hefeextrakt
	7,0±0,2	pH-Wert

Das Medium wurde bei Fluka Analytical (Partner von Sigma-Aldrich), Seelze als Trockenpräparat erworben und nach Herstellerangaben mit 1000 ml destilliertem Wasser versetzt. Die Sterilisation fand bei 120°C für 30 Minuten statt. Gelagert wurde das Medium bei 4°C über mehrere Monate.

<i>SOC-Medium:</i>	2 g/l	Trypton
	0,5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	Natriumchlorid
	2,5 mM	Kaliumchlorid
	10 mM	Magnesiumchlorid
	20 mM	Glucose

Das Medium wurde als Fertigpräparat von der Firma Promega bezogen und konnte bei RT über mehrere Monate gelagert werden.

<i>ZymoBroth- Medium:</i>	0,5 - 5%	Trypton
	0,5 - 5 %	Hefeextrakt
	10 mM	Magnesiumchlorid

Das Medium wurde als Fertigpräparat von der Firma Zymo Research bezogen und bei RT über mehrere Monate gelagert.

2.3.3 Transformation von Plasmid-DNA

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden bei - 80°C gelagerte Gefrierkulturen eines Bakterienstammes (Kapitel 2.3.1) auf Eis aufgetaut und 35 - 50 µl der Bakterienkultur mit 20 - 50 ng Plasmid-DNA versetzt. Die Suspension wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert, ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden durchgeführt und erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Für etwa 1 Stunde wurde der Ansatz nach Zugabe von 1 ml Medium mit Resistenzfaktor bei 37°C inkubiert, bevor er auf einem Selektivmedium (LB, NZYM) ausgestrichen wurde. Die Platten wurden üN bei 37°C im Brutschrank gelagert.

2.3.4 Kultivierung von Bakterienkulturen

Von einem bewachsenen Nährboden wurde mittels einer Impföse ein Klon entnommen und temperiertes Medium damit angeimpft. Die Kultur wurde üN bzw. für mindestens 8 Stunden bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Eine üN-Kultur wurde bei 37°C und 220 - 225 rpm im Ampere Chart Multitron II Schüttler inkubiert. Die Vorkultur wurde in 30 - 50 ml Medium (LB, NZYM) mit Resistenzfaktor überführt und erneut für 8 - 12 Stunden bei 37°C und 220 - 225 rpm inkubiert. Zur Aufreinigung extrachromosomaler DNA wurde das CompactPrep Midi Core Kit (100) [Qiagen GmbH] verwendet und nach Herstellerangaben die Plasmid-DNA isoliert.

1. 30 - 50 ml der Bakterienkultur bei 4°C und 5000 rpm für 15 Minuten pelletiert
2. Pellet wurde in 2 ml Resuspensionspuffer (P1) gelöst und mit 2 ml Lysispuffer (P2) versetzt, zum Durchmischen wurden die Reaktionsgefäße 4 - 6 mal energisch geschüttelt und anschließend für 3 Minuten bei RT inkubiert
3. Lysat wurde mit 2 ml Neutralisationpuffer (S3) versetzt und wiederum 4 - 6 mal energisch geschüttelt
4. Lysat wurde anschließend bei 11000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, der Durchlass verworfen und die Reaktionsgefäße erneut für 15 Minuten zentrifugiert
5. Lysat mit 2 ml Bindepuffer (BB) versetzt, 4 - 6 mal energisch vermischt und in ein CompactPrep Midi Säulenröhrchen überführt

Zum Beladen des Lysats durch die Membran im Säulenröhrchen wurde eine Vakuumpumpe verwendet.

6. nach dem Überführen des Säulenröhrchens in ein neues Reaktionsgefäß, wurde es mit 700 µl Waschpuffer (PE) beladen und bei 13000 rpm für 30 - 60 Sekunden zentrifugiert
7. eine erneute Zentrifugation bei 13000 rpm für 60 Sekunden entfernte zurück-

- gebliebenen Waschpuffer
8. Elution der auf der Membran gebundene chromosomale DNA durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (EB) auf die Säule, für 60 Sekunden bei RT inkubiert und erneut bei 13000 rpm für 60 Sekunden zentrifugiert

Miniprep von Plasmid-DNA:

Für die Aufreinigung kleinerer Mengen von Plasmid-DNA wurde das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System [Promega Cooperation] verwendet.

Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

1. 1 - 10 ml einer Bakterienvorkultur bei 5000 rpm für 5 Minuten pelletiert
2. Zellpellet in 250 µl Zellresuspensionspuffer gelöst
3. Zellsuspension mit 250 µl Lysispuffer und 10 µl Alkaline Protease-Lösung versetzt, viermal geschüttelt und für 5 Minuten bei RT inkubiert
4. 350 µl Neutralisationspuffer zu Lysat gegeben, viermal geschüttelt und bei 13000 rpm für 10 Minuten in der Eppendorf Centrifuge 5415D zentrifugiert
5. klaren Überstand abgenommen und in Säulenröhrchen überführt; Zentrifugation für 60 Sekunden bei 13000 rpm
6. Säule wurde mit 750 µl Waschpuffer bei 13000 rpm für 60 Sekunden gewaschen
7. Waschschrift mit 250 µl Waschpuffer bei 13000 rpm für 2 Minuten wiederholt
8. auf der Säule gebundene Plasmid-DNA mit 100 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert, 60 Sekunden bei RT inkubiert und erneut bei 13000 rpm für 60 Sekunden zentrifugiert

Abschließend wurde mittels des Nano Drop® Spectrophotometer ND-1000 die Konzentration der isolierten DNA bestimmt.

Um die Plasmid-DNA auch von Endotoxinen zu befreien wurde das MiraCLEAN® Endotoxin Removal Kit [Mirus Corporation] verwendet. Nach Herstellerangaben wurde die gewonnenen DNA-Proben mit PBS- oder TE-Puffer auf eine Konzentration von 0,5 - 1,0 mg/ml verdünnt. Hierzu wurden 0,1 Volumen MiraCLEAN® Puffer zugegeben, gevortext und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde mit 0,03 Volumen EndoGO Extraktionsreagenz versetzt, gevortext und erst 5 Minuten auf Eis und anschließend 5 Minuten in einem 50°C warmen Wasserbad inkubiert. Um eine Abtrennung der mit Endotoxin versetzten Bestandteile zu erzielen wurden die Reaktionsgefäße bei 13000 rpm für 20 - 60 Sekunden zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Zugabe von 0,03 Volumen EndoGO Extraktionsreagenz wurden ein zweites Mal wiederholt und die Reaktionsgefäße erst für 5 Minuten auf Eis und anschließend für 5 Minuten in einem 50°C warmem Wasserbad inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 - 60 Sekunden wurde der klare Überstand entnommen und mit 2 Volumen eiskaltem 96 % Ethanol versetzt, für

mindestens 30 Minuten bei -20°C oder kälter inkubiert und anschließend bei 4°C und 13000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das verbliebene Pellet wurde in 50 - 100 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, bei der RNA- oder DNA-Proben ihrer Größe nach in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die Größenbestimmung der einzelnen Fragmente erfolgte mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größenstandard (Marker). Die Gele wurden in 1 - 1,5 % Agarose in 1x TAE-Puffer gelaufen. Für die Sichtbarmachung der Probenfragmente wurden 0,1 µg/ml bis 0,5 µg/ml Ethidiumbromid dem Gel zugegeben. Die Auswertung erfolgte im GELDOC [Biorad].

<i>50x TAE-Puffer:</i>	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA-Lösung

Zur Herstellung des Laufpuffers für die Agarose-Gelelektrophorese wurden die angegebenen Zutaten in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

2.3.7 Gelextraktion

Die Extraktion des gesuchten Fragmentes aus dem Agarosegel wurde unter Zuhilfenahme eines Gelextraktionskits [Qiagen GmbH] durchgeführt. Hierzu wurde das im Gel aufgetrennte Fragment ausgeschnitten, dessen Gewicht bestimmt und mit QG Puffer (Solubilization) versetzt. Für 10 Minuten wurden die Proben bei 55°C inkubiert und alle 2 bis 3 Minuten gevortext. Nach dem Farbumschlag wurde zum vorliegenden Probenvolumen ein Volumen Isopropanol zugegeben und das Gemisch in einem Säulenröhrchen zentrifugiert (60 Sekunden bei 13000 rpm), der Unterstand verworfen und die Säule mit 500 µl QG Puffer beladen und wiederum für 60 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Unterstand wurde erneut verworfen, die Säule mit 750 µl PE Puffer beladen und für 60 Sekunden zentrifugiert. Zum Lösen der gebundenen DNA wurden 50 µl EB Puffer (10 mM Tris-HCl) oder destilliertes Wasser (pH 7,0 - 8,5) zugegeben und durch Zentrifugation (60 Sekunden bei 13000 rpm) die von der Membran gewaschen.

2.3.8 Klonierung

2.3.8.1 Plasmide

Backbone Vektoren:

pcDNATM 3.1(-) [Invitrogen]

pCI neoMammalian Expression Vector [Promega Corporation]

pTargetTM Mammalian Expression Vector System [Promega Corporation]

HIV Vektor *pNL4.3* (Plasmid infektiöser HIV-Partikel) [GenBank: AF324493.1]

Hausintern klonierte Vektoren:

pcDNase; *pcDNaseA2*

pTargetSe; *pTargetSeA2*

2.3.8.2 Enzyme

Enzym		Hersteller
<i>Restriktionsenzyme</i>		
<i>Eco</i> RI		Fermentas
DpnI		Agilent Technologies
HindIII		Fermentas
NheI	10u/μl	Fermentas
NotI	10u/μl	New England BioLabs [®] Inc.
SacI	20u/μl	New England BioLabs [®] Inc.
XbaI	10u/μl	Fermentas
<i>Polymerasen</i>		
<i>Pfu</i>		Agilent Technologies
GoTaq [®] Hot Start		Promega
AmpliTaq Gold		Promega
<i>Ligasen</i>		
T4 DNA Ligase	5u/μl	Fermentas
T4 DNA Ligase	1-3u/μl	Promega

2.3.8.3 Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
T7-Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Sigma
SK68i	5'-GGARCAGCIGGAAGCACIATGG-3'	RKI
SK69i	5'-CCCCAGACIGTGAGITICAACA-3'	RKI
8116F	5'-AATTAACAATTACCAAAGCTTAATACAC-3'	Sigma
8116R	5'-GTGTATTAAGCTTTGGTAATTGTTAATT-3'	Sigma
8221F	5'-GTGGAATTGGTTTTACCATAACAAATTGGCTGTGG-3'	Sigma
8221R	5'-CCACAGCCAATTTGTTATGGTAAACCAATTCCAC-3'	Sigma

2.3.8.4 Restriktion

Zur Spaltung von Plasmid-DNA und mittels PCR erzeugter DNA-Fragmente wurden Restriktionsendonukleasen (Kapitel 2.3.8.2) verwendet, die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden (SZYBALSKI *et al.*, 1991). Die Verwendung dieser Enzyme erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen oder Restriktionsnezymen wurde für analytische und präparative Zwecke verwendet. Analytische Ansätze erfolgten zur Kontrolle auf erfolgreiche Ligation von DNA-Fragmenten. Zur Konstruktion neuer Mutanten wurden Restriktionsansätze im präparativen Maßstab durchgeführt (MÜLHARDT, 1999). Die Zusammensetzung der Ansätze ist nachfolgend aufgeführt. Die Restriktionsansätze wurden für 30 bis 60 Minuten bei enzymespezifischer Temperatur inkubiert und die Restriktionsenzyme durch Erhitzen inaktiviert. Gesuchte Fragmente wurden durch die Agarose-Gelelektrophorese von anderen abgetrennt, aus dem Gel geschnitten und durch das QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt.

Für die Restriktion isolierter Plasmid-DNA wurde folgender Ansatz pipettiert:

Reagenz	Konzentration	1x
Puffer	10x	1µl
Enzym		1µl
H ₂ O		Rest
Σ Ansatz		10µl

Zum Restriktionsansatz wurden je 300 ng DNA hinzugegeben. Die Restriktion wurde für 30 Minuten bis zu 1 Stunde, je nach Eigenschaften der verwendeten Enzyme bei 37°C inkubiert.

2.3.8.5 Ligation

Die Restriktionsverdauten DNA-Fragmente wurden mit gleichartig geschnittenen Plasmiden in einer Ligation und unter Zuhilfenahme einer T4 DNA Ligase in einem ATP-haltigen Puffer fusioniert. Für eine Ligation wurde folgender Ansatz pipettiert:

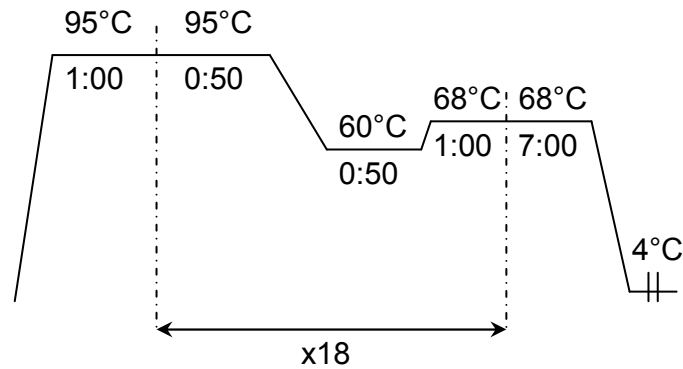
Reagenz	Konzentration	1x
T4 DNA Ligase		1µl
Ligasepuffer	10x	2µl
H ₂ O		Rest
Σ Ansatz		20µl

Zum Ansatz wurde Plasmid-DNA und Insert in einem Verhältnis von 1:1 (3:1 bzw. 1:3) zugegeben und für 1 Stunde bei RT (alternativ für 6 bis 8 Stunden bei 14°C oder üN bei 4°C) inkubiert.

2.3.8.6 Site-Directed Mutagenesis (SDM)

Die Methode der Site-Directed-Mutagenesis ist ein molekularbiologisches Verfahren um definiert Stellen innerhalb eines DNA-Moleküls oder zirkulärer Plasmid-DNA zu modifizieren. Für die Durchführung dieser Substitution wurde das Quik Change® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit [Stratagene] verwendet. Für die Reaktion wurde folgender Ansatz zusammen pipettiert:

Reagenz	Konzentration	1x
Reaktionspuffer	10x	5µl
dsDNA Template	10ng	1µl
Primer Forward	125ng	1µl
Primer Reverse	125ng	1µl
dNTP Mix		1µl
Quick Solution		3µl
H ₂ O		38µl
Σ Ansatz		50µl
+ <i>Pfu</i> Polymerase		1µl



Den amplifizierten Ansatz wurde nach der PCR für 2 Minuten auf Eis inkubiert, mit 1 μ l *DpnI* (10 U/ μ l) versetzt und nach kurzem Mischen die Reaktion für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. *DpnI* schneidet dabei spezifisch methylierte, unmutierte DNA-Stränge und es verbleibt das unmethylierte Plasmid. Für die Transformation wurde 1 μ l der *DpnI* verdauten Probe zu einem Zellaliquot XL10-Gold Ultracompetent Cells pipettiert und nach Herstellerangaben durch Hitzeschock transformiert. Selektiert wurden die Klone nach einer Inkubation üN bei 37°C auf LB-Agarplatten durch Blau-Weiß-Selektion.

2.3.8.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion findet Anwendung bei der Amplifikation von DNA-Fragmente *in vitro* unter Zuhilfenahme von DNA-Polymerasen. Das Verfahren ermöglicht einen schnellen und empfindlichen Nachweis kleinster DNA- oder RNA-Mengen. Die exponentielle Verdopplung der zu amplifizierenden DNA-Sequenzen erbringt große Mengen genetischen Materials in kurzer Zeit.

Für die Reaktion wurde folgende Ansatz pipettiert:

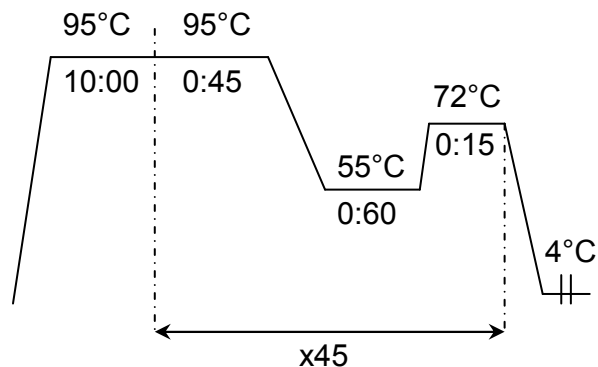
Reagenz	Konzentration	1x
Puffer	5x	10 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase		1 μ l
dNTP's	10pmol/ μ l	4 μ l
MgCl ₂	25mM	2 μ l
Primer F		1 μ l
Primer R		1 μ l
H ₂ O		30,5 μ l

Zu einem Gesamtansatz von 50 μ l Reaktionsvolumen wurden jeweils 300 ng DNA für die Analyse zugegeben.

2.3.8.8 Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real Time-PCR)

Die Amplifikation einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion wird mit einer zusätzlichen Quantifizierung der gewonnen DNA kombiniert. Die Real Time-Quantifizierung ermöglicht, einen außerordentlich langen linearen Messbereich (bis zu 6 log₁₀-Stufen) durch kontinuierliche Messung eines je nach PCR-Produktmenge zunehmenden Fluoreszenzsignals während der Amplifikation zu erfassen. Bestimmt wird dabei der Cycle Threshold (CT), der Zeitpunkt, ab dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert (Cut-off) überschreitet. Je mehr DNA am Anfang in der Reaktion vorhanden ist, desto früher wird der Cut-off-Wert überschritten. Durch den Vergleich mit mitgeführten Verdünnungen der Positivkontrolle wird das Ergebnis in Menge amplifizierter DNA umgerechnet. Das bekannteste Verfahren zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals für Real-Time-Quantifizierungen ist die TaqMan-Methode, auch als 5'-Exonuclease-Assay bezeichnet. Für den Lauf wurde folgender Ansatz zusammen pipettiert:

Reagenz	Konzentration	1x
PCR-Puffer	10x	2,2µl
Mg ₂ Cl	25mM	1,75µl
dNTP's	10mM	0,63µl
Primer Virus FOR (68)	10pmol/µl	0,5µl
Primer Virus REV (69)	10pmol/µl	0,5µl
Sonde Virus (Fam)	10pmol/µl	0,5µl
AmpliTaQ Gold	5U/µl	0,25µl
H ₂ O		14,17µl
Σ Ansatz		20,5µl



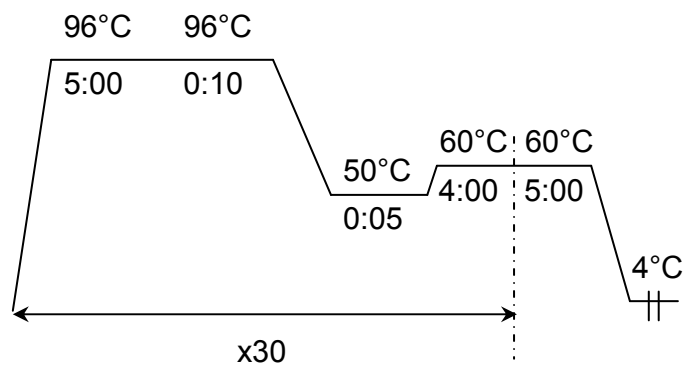
Der PCR-Ansatz wurde unter sterilen Bedingungen in einer DNA-freien Box pipettiert. Die DNA wurde in einer Konzentration von etwa 100 - 150 ng/ Ansatz zugegeben. Die Auswertung erfolgte mit dem MxPro- Mx3000P.

2.3.8.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA diente der Überprüfung der Richtigkeit rekombinierter DNA bzw. der Integration gewünschter DNA-Fragmente in das Zielgenom. Die moderne DNA-Sequenzierung nutzt die Methode der PCR. Für die Auswertung wurden dem Ansatz markierte ddNTP's im ABI Big Dye-Master Mix zugesetzt.

Sequenzierungsansatz und Thermoprofil der Sequenzierung:

Reagenz	Konzentration	1x
Big Dye		1µl
ABI-Puffer	5x	2µl
Primer FOR	10pmol/µl	1µl
Primer REV	10pmol/µl	1µl
H ₂ O		Rest
Σ Ansatz		10µl



2.4 Immunisierung und Analyse tierischer Seren

2.4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden eine Ziege (BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung, Tierversuchsanstalt, Berlin-Marienfelde) und mehrere Wistar Ratten (RKI, Robert Koch-Institut, Tierversuchsanstalt, Berlin-Wedding) mit den hergestellten bzw. kommerziell erworbenen Antigenen immunisiert. Die Ratten wurden in Gruppen von je vier Tieren gehalten. Die Ziege wurde in der Tierversuchsanstalt des BfR in Berlin-Marienfelde gehalten.

2.4.2 Aufarbeitung tierischer Seren

Nach der Blutabnahme durch Mitarbeiter des Tierstalls wurde die Seren für 2 Stunden bei RT inkubiert und der „Blutkuchen“ konnte sich absetzen und mehrere Stunden später konnte das Serum abgenommen werden. Die Seren wurden anschließend mehrmals für 10 Minuten bei

4000 bis 10000 rpm zentrifugiert, um verbliebene blutrückstände zu entfernen. Das gereinigte Serum wurde in Reaktionsgefäße für die Aufbewahrung bei -80°C aliquotiert.

2.4.3 Immunisierung der Versuchstiere

Das Antigen wurde 1:1 mit öligem Adjuvant (Incomplete Freund's Adjuvant bzw. Complete Freund's Adjuvant) versetzt. Durch mehrfaches Resuspendieren durch eine Kanüle (Ø 0,6 mm) erhielt das Gemisch eine halbfeste, cremige Konsistenz. Die Immunisierung der Versuchstiere erfolgte alle drei Wochen durch intramuskuläre und subkutane Injektion des Antigen-Adjuvant-Gemisches. Dabei wurden pro Tier etwa 250 ng Antigen appliziert. Die Immunisierung, die regelmäßige Blutung und die vollständige Entblutung der Tiere wurden durch Fachpersonal des am Nordufer 20, Berlin ansässigen Tierstalls des Robert Koch-Institutes durchgeführt.

2.4.4 Kommerzielle Antikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Anti-Human Immunoglobulins</i> (Fab specific)-Alkaline Phosphatase antibody produced in goat affinity isolated antibody	Sigma
<i>Anti-Rabbit Immunoglobulins</i> (whole molecule)-Alkaline Phosphatase antibody produced in goat affinity isolated antibody	Sigma
<i>Anti-Rat Immunoglobulins</i> (whole molecule)- Alkaline Phosphatase developed in goat affinity isolated antigen specific antibody	Sigma
<i>Anti-Goat Immunoglobulins (H+L)</i> AP-Rabbit	Zymed (Invitrogen)
<i>Polyclonal Rabbit Anti-Human</i> Immunoglobulins/ Horseradish peroxidase (IgG/ HRP)	Dako
<i>Polyclonal Goat Anti-Rabbit</i> Immunoglobulins/ Horseradish peroxidase (IgG/ HRP)	Dako
<i>Polyclonal Rabbit Anti-Rat</i> Immunoglobulins/ Horseradish peroxidase (IgG/ HRP)	Dako
<i>Polyclonal Rabbit Anti-Goat</i> Immunoglobulins/ Horseradish peroxidase (IgG/ HRP)	Dako

2.4.5 Western Blot-Analyse

Bei der Untersuchung tierischer Seren auf eine Immunreaktion wurde das Western Blot-Verfahren zur Detektion einer Antikörperbindung am Antigen verwendet. Zur Präparation der testbaren Membranen wurde das Protein T20, viraler Überstand pNL 4.3 und rekombinantes gp41 im Gel aufgetragen und im Western-Blot-Verfahren (Kapitel 2.4.5) die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Blotmembran wurde in Streifen geschnitten und in 6 % Milchlösung für 4 Stunden bei RT oder üN bei 4°C blockiert. Die Streifen wurden mit dem zu untersuchenden Serum (1:100 bis 1:1000) beladen und für 1 bis

2 Stunden bei RT inkubiert. Die Blotstreifen wurden anschließend fünfmal für 5 Minuten in PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und mit dem Zweitantikörper beladen. Der Zweitantikörper war mit Alkalischer Phosphatase (AP) gelabelt. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:3000 für 1 Stunde auf den Blotstreifen inkubiert und anschließend fünfmal für 5 Minuten in PBS + 0,1 % Tween 20 und einmal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Durch die Labelung des Sekundärantikörpers mit Alkalischer Phosphatase war eine Detektion mit Röntgenfilm nicht möglich, deshalb wurde folgende Entwicklerlösung angesetzt:

Alkaline Phosphatase-Puffer:

100 mM	Tris-HCl (pH 9,0)
150 mM	Natriumchlorid
1 mM	Magnesiumchlorid

Zur Pufferherstellung wurden alle Inhaltsstoffe in destilliertem Wasser gelöst und zu 5 ml des alkalischen Puffers 33 µl NBT und 16,5 µl BDIP gegeben.

Die Blotstreifen wurden für einige Minuten in der Entwicklerlösung inkubiert. Nach kurzer Zeit war ein Farbumschlag zu erkennen.

2.4.6 Epitopmapping

6 % Magermilchlösung:

6 g	Magermilchpulver
100 ml	PBS + Tween 20

6 g Magermilchpulver wurden auf 100 ml PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20 eingewogen und mittels eines Rührers sorgfältig verrührt. Die Magermilchlösung wurde einmal wöchentlich frisch angesetzt und bei 4°C gelagert.

Das Epitopmapping ist ein Verfahren zur Charakterisierung eines Antikörpers, welches eine schnelle Eingrenzung antikörper- und serumspezifischer Epitope auf einem bekannten Antigen ermöglicht. Im Epitopmapping werden Proteine überlappend auf eine Nitrocellulose oder alternativ auf eine PVDF-Membran punktiert. Die Anbindung eines Antikörpers an einem bestimmten Proteinabschnitt beschreibt eine spezifische Bindung. Man unterscheidet hierbei zwischen kontinuierlichen und diskontinuierlichen Epitopen. Bei kontinuierlichen Epitopen liegen Aminosäuren direkt nebeneinander. Ein Antikörper, der ein solches Epitop erkennt, bindet sequenzspezifisch. Bei diskontinuierlichen Epitopen liegen die Aminosäuren eines Epitopes in der Primärstruktur des Proteins. Auf der Membran liegen sie jedoch nicht

direkt nebeneinander, sondern werden erst bei der Faltung des Proteins in räumliche Nähe zueinander gebracht. Auf der entwickelten Membran kann sich dies durch entfernt von einander detektierte Peptide zeigen. Antikörper die diskontinuierliche Epitope erkennen, werden konformationspezifisch genannt.

Für die Herstellung von Epitopmappingmembranen wurden Proteine mittels einer Multikanalpipette überlappend auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht. Die zu untersuchenden Proteine wurden abhängig von ihrem Löslichkeitsverhalten entweder 1:10 in DMSO (10 µg Peptid) oder 1:4 in PBS (1 mg Peptid) gelöst und tropfenweise (je 2 µl) auf die Membran aufgetragen. Für die Analyse wurden die Membranen in einer 6 % Milchlösung über mehrere Stunden, wahlweise üN, inkubiert. In einem Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 wurde das zu untersuchende Serum in 6 % Milchlösung verdünnt auf die Membran aufgebracht und diese für mindestens 1 Stunde bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend fünfmal 5 Minuten in PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen. Der Zweitantikörper wurde in einem Verhältnis von 1:1000 bis 1:10000 in 6 % Milchlösung verdünnt und für etwa 1 Stunde bei RT auf der Membran inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut fünfmal für 5 Minuten in PBS + Tween 20 gewaschen. Die Detektion der auf der Membran gebundenen Antikörper wurde durch die Zugabe von Pierce ECL Western Blotting Substrate ermöglicht, indem beide Entwicklerkomponenten 1:1 vermischt wurden. Durch das Auflegen eines X-Ray-Filmes wurden Bindungsstellen detektiert und im CURIX60 LC 50Hz [Agfa] ausgewertet.

Verwendung kommerzieller Epitope mapping-Membranen von JPT:

<i>Milchpuffer:</i>	10 ml	Fötales Kälberserum (FKS)
	3 g	Magermilchpulver
	1 g	Bovine Serum Albumin (BSA V)

Für die Herstellung des Milchpuffers wurden alle Inhaltsstoffe in TBS-T-Puffer gelöst.

<i>TBS-Puffer:</i>	50 mM	Tris
	137 mM	Natriumchlorid
	2,7 mM	Kaliumchlorid

Alle Inhaltsstoffe des Puffers wurden in destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Salzsäure auf 8,0 eingestellt.

<i>TBS-T-Puffer:</i>	500 ml	TBS-Puffer (pH 8,0)
	25 µl	Tween 20

Für die Analysen der Tierseren wurden auch kommerzielle Epitopemappingmembranen der Firma JPT Peptide Technologies GmbH mit synthetisch hergestellten Peptiden verwendet.

Für die Erstbenutzung wurde die Membran durch eine 5-minütige Inkubation in Methanol aktiviert. Sie wurde weiterhin dreimal für 10 Minuten in TBS-Puffer gewaschen, bevor sie für 2 Stunden in Milchpuffer blockiert wurde. Nach der Inkubation wurde in einem Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 das zu untersuchende Serum in Milchpuffer verdünnt auf die Membran aufgebracht und diese für 3 Stunden bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde einmal für 10 Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen, bevor sie mit einem Peroxidase-gelabelten Zweitantikörper (Anti-Rat, Anti-Goat, etc. HRP) beladen wurde. Der Zweitantikörper wurde 1:10000 in Milchpuffer verdünnt und die Membran für 1 Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran zuletzt dreimal für 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Für die mehrmalige Verwendung einer Membran wurde diese nach Herstellerangaben wie folgt regeneriert.

Regenerationspuffer I:

62,5 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
2 %	Natrium-Dodecylsulfat (SDS)

Für den Regenerationspuffer I wurden Tris und SDS in destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Salzsäure auf einen Wert von 6,7 eingestellt. Pro 10 ml Puffer wurden abschließend 70 µl β-Mercaptoethanol zugegeben.

Regenerationsprotokoll I:

1. Membran dreimal für 10 Minuten bei RT mit destilliertem Wasser waschen
2. Membran viermal für 30 Minuten bei 50°C mit dem Regenerationspuffer I waschen
3. Membran dreimal für 20 Minuten bei RT mit PBS waschen
4. Membran dreimal für 20 Minuten bei RT mit TBS-T-Puffer waschen
5. Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-Puffer waschen

Um eine erfolgreiche Regeneration der Membran zu überprüfen wurde diese abschließend noch einmal mit dem Zweitantikörper (HRP) für 1 Stunde bei RT inkubiert und mittels eines X-Ray-Films detektiert.

2.4.7 ELISA (Enzym Linked Immunoabsorbent Assay)

Die Platten für den Enzym Linked Immunoabsorbent Assay wurden mit den Peptiden T20 und C39 über Nacht bei 4°C beladen (gecoatet). Dafür wurden die 96-Wellplatten mit jeweils 50 µl/Well beladen. Im Well wurde jeweils eine Endkonzentration von 1 µg/Well Protein

erreicht. Die Platte wurde einmal mit 300 µl/ Well PBS + 0,05 % Tween gewaschen. Anschließend wurde die Platte für 1 Stunde bei 37°C in 5 % Albumin Fraction V (BSA) in PBS + 0,05 % geblockt. Pro Well wurden dafür 100 µl aufgetragen. Die Platte wurde erneut dreimal mit 300 µl/Well PBS + 0,05 % Tween gewaschen. Das Ratten- bzw. Ziegenserum wurde als Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:3600 in 2,5 % BSA in PBS + 0,05 % Tween verdünnt eingesetzt. Inkubiert wurde die Platte 1,5 bis 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Es folgte ein weiterer Waschschrift, bei dem die Platte erneut dreimal mit 300 µl/Well PBS + 0,05 % Tween 20 behandelt wurde. Der Zweitantikörper, je nach zuvor verwendeter Spezies Anti-Human, Anti-Rat oder Anti-Goat, wurde ebenfalls in 2,5 % BSA in PBS + 0,05 % Tween 20 1:50 bis 1:3600 verdünnt. Die Platte wurde 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde im Anschluss daran mit einem siebenfachen Waschzyklus mit 300 µl/Well PBS + 0,05 % Tween gewaschen.

Zur Detektion der an das Protein gebundenen Antikörper wurde eine o-Phenylenediamine dihydrochloride-Tablette (30 mg) in 30 ml PBS gelöst, 200 µl Wasserstoffperoxid zugegeben und je 80 µl Entwicklerlösung auf jedes Well verteilt. Möglichst lichtdicht verschlossen wurde die Platte 20 Minuten inkubiert, bis im Well ein Farbumschlag zu erkennen war. Zum Abstoppen dieser Reaktion wurden pro Well 80 µl 5 N Wasserstoffperoxid zugegeben. Für die Auswertung der Resultate im ELISA wurde der TECAN Spectra Classic Plate Reader verwendet.

2.4.8 Analyse der Seren auf neutralisierende Eigenschaften

Der *in vitro* Neutralisationstest ist ein Verfahren zur Bestimmung Virus-neutralisierender Seren der immunisierten Ratten und der Ziege.

2.4.8.1 Virusherstellung

Für die Herstellung neuen infektiösen Viruses wurden 293T-Zellen mit dem Plasmid pNL 4.3 (2 µg/ml) transfiziert und nach einer Inkubation von zwei Tagen bei 37°C der Überstand von den Zellen abgenommen. Um den Überstand und damit infektiöse Viruspartikel von anderen Proteinen und Zellausscheidungen abzutrennen, wurde eine Aufreinigung mit Sucrose durchgeführt. Hierfür wurden Beckman Zentrifugenröhrchen mit 2 ml 20 % Sucrose gefüllt und der Überstand vorsichtig darauf geschichtet. Um ein Wandern des Überstandes und damit eine Aufreinigung durch die Sucrose zu erreichen wurden die Proben für 2:10 Stunden bei 32000 rpm zentrifugiert. Der verliebene Überstand und die Sucrose wurden vorsichtig aus dem Röhrchen abgenommen. Am Röhrchenboden verblieb ein kleines Pellet infektiösen

Virus, welches mit 20 µl TE-Puffer resuspendiert wurde. Durch die Sucrose fand neben einer Aufreinigung auch eine Aufkonzentrierung des Virus statt.

2.4.8.2 Bestimmung des Virustiter

Um die Effizienz des gewonnenen Virus zu bestimmen wurde dessen Titer ermittelt. Der Virustiter ist ein Maß für den Gehalt an infektiösen Viruspartikeln in einer Lösung. Er bezeichnet die höchste Verdünnung eines Virus, die je nach angewandter Untersuchungstechnik eine krankmachende Wirkung erzielt.

Zur Bestimmung des Virustiter wurden 293T-Zellen üN bei 37°C in einer 96-Well-Platte kultiviert und nach 24 Stunden in Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-6} mit infektiösem Überstand (Virus) versetzt. Je 10 µl des vorangegangenen Wells wurden mit 90 µl DMEM des nachfolgenden Wells vermischt. Nach zwei Tagen bei 37°C wurde der Überstand von den Zellen wieder abgenommen und zwei Waschschrte mit je 100 µl PBS durchgeführt, bevor die Zellen für 5 bis 20 Minuten in 2 % PFA fixiert wurden. Für die Detektion infizierter Zellen wurde eine Entwicklerlösung angesetzt, die mit je 60 µl/Well für 30 Minuten auf die Zellen gegeben wurde. Nach 30 Minuten konnten erste infizierte Zellen (blau) ausgezählt werden. Die Zahl der infizierten Zellen ließ Rückschlüsse auf den Virustiter zu.

Entwicklerlösung:

4 ml	PBS
500 mM	Kaliumhexacyanidoferrat(III)
250 mM	Kaliumhexacyanidoferrat(II)
1 M	Magnesiumchlorid
80 µl	X-Gal

2.4.8.3 Neutralisationstest

Die Seren der immunisierten Versuchstiere wurden im Neutralisationstest getestet, um deren neutralisierende Wirkung auf HIV zu untersuchen und gebildete Antikörper zu detektieren. Hierfür wurden 293T-Zellen üN in einer 96-Well-Platte bei 37°C kultiviert. Es wurden Stocklösungen des Antikörpers 2F5 und HIV wie folgt vorbereitet:

2F5-Stocklösung: 2 µl 2F5 (10 mg/ml)
 100 µl DMEM

Ergibt eine Endkonzentration von 200 µg/ml von 2F5.

Virus-Stocklösung: 120 µl HIV_{pNL4.3} Klon

2280 μ l DMEM
Der Virustiter lag zwischen 2×10^6 und 5×10^6 .

Für die Versuchsdurchführung wurden die zu untersuchenden Seren erst 1:10 (10 μ l Serum + 90 μ l DMEM) und in den folgenden Reihen der 96-Well-Rundboden-Platte jeweils 1:2 verdünnt. Die Verdünnungsreihe setzte sich von der ersten bis zur letzten Reihe fort.

Das Virus wurde zu gleichen Teilen (25 μ l) auf eine weitere 96-Well-Rundboden-Platte aufgeteilt und mit 25 μ l der Serum-DMEM-Verdünnungen vereint. Die Virus-Serum-Platte wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Virus-Serum-Gemisch wurde anschließend reihenweise auf die Zellen der ersten 96-Well-Platte gegeben und diese für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Um eine Sekundärinfektion durch neu gebildete Viruspartikel zu vermeiden, wurde nach 24 Stunden das Medium erneuert. Nach zwei Tagen bei 37°C wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und diese zweimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu fixieren wurden pro Well 80 μ l 2 % PFA aufgegeben und die Platte für 5 bis 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und mit 60 μ l Entwicklerlösung versetzt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die infizierten Zellen (blau) konnten nun ausgezählt werden.

Entwicklerlösung

3 Ergebnisse

3.1 Immunisierung mit rgp41 zur Gewinnung neutralisierender

Antikörper

Zur Gewinnung eines permanent zur Verfügung stehenden rgp41 sollte eine fortwährend Protein exprimierende Zelllinie etabliert werden. Durch die ständige Verfügbarkeit des Antigens sollte es möglich werden, Immunisierungen im Tiermodell in kurzen Zeitintervallen und hohen Dosierungen vorzunehmen, um hohe Immunantworten der Versuchstiere und damit die Bildung neutralisierender Antikörper zu induzieren. Vorversuche zur Untersuchung der Reaktivität der Versuchstiere auf das verabreichte Antigen wurden mit dem Expressionskonstrukt pcDNASeA2 durchgeführt. Die Bezeichnung *pcDNA* beschreibt den eingesetzten Expressionsvektor, während *Se* die Verkürzung des Hüllproteins Env (short env) beschreibt. Es wurde also die Ectodomäne von gp41 von HIV-1 kloniert. *A2* benennt die Position der durch Site-Directed Mutagenesis herbeigeführten Punktmutation. In der Sequenz wurde an zweiter Stelle die Aminosäure Alanin (*A*) durch die Aminosäure Glutamin (*Q*) ausgetauscht. Die aus der Immunisierung resultierende Immunantwort zeigte nicht bei allen Tieren eine Reaktion auf rgp41.

3.1.1 Produktion von rgp41 durch Transfektion mit pcDNASeA2

Für die Produktion des rgp41 als Antigen für die Anwendung im Kleintiermodell wurde das bereits vorhandene Vektorkonstrukt pcDNASeA2 verwendet. Wie in den Kapiteln 2.2.7 und 2.2.8.2 beschrieben, wurden 293T-Zellen mit pcDNASeA2 transfiziert und der Überstand nach zwei Tagen aufgereinigt. Zelluläre Bruchstücke des rgp41 wurden durch mehrmaliges Zentrifugieren und Filtrieren (\varnothing 0,45 μ m Filter) abgetrennt. Der im Säulenröhrchen aufkonzentrierte Zellüberstand wurde mittels Elektrophorese (Kapitel 2.2.9) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Kapitel 2.2.10). Durch die Detektion mit 2F5-Antikörpern wurde nachgewiesen, dass rgp41 exprimiert wurde (Abb. 3.1). Die Konzentration des in den Überstand abgegebenen Proteins wurde unter Verwendung von Verdünnungsreihen des viralen Peptides T20 bestimmt. Im Western Blot wurde eine große Bande aus Di- und Trimeren des rgp41 mit einer Größe von etwa 41 kD detektiert.

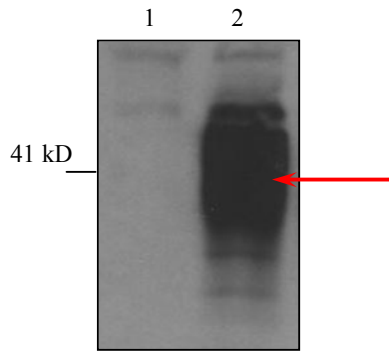


Abb. 3.1: Nachweis des exprimierten Proteins rgp41 für die Immunisierung der Versuchstiere; detektiert durch 2F5 in der Western Blot-Analyse (1 - Mock; 2 - pcDNASeA2; roter Pfeil: rgp41)

Die Expression des Proteins durch Transfektion von 293T-Zellen mit dem pcDNASeA2 Vektor konnte in der Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Weltweit war es hier erstmals möglich das transmembrane Hüllprotein gp41 in humanen Zellen zu produzieren und im Überstand nachzuweisen.

3.1.2 Immunisierung und Analyse der Immunseren

Nach der Überprüfung der Richtigkeit des exprimierten Proteins und dessen Charakterisierung wurde dieses für die Immunisierung der Ratten und der Ziege bereitgestellt. Die Immunisierung mit dem Antigen erfolgte alle drei Wochen über einen Zeitraum von zwei bis drei Monaten. Parallel zur Immunisierung wurden den Tieren geringe Mengen Blut für Analysezwecke entnommen und die Reaktivität der Seren getestet.

3.1.2.1 Immunisierungsmodus

Der von den transfizierten 293T-Zellen gewonnene Zellüberstand wurde für die Verwendung als Antigen vorbereitet (Kapitel 2.2.8.2). Über einen Zeitraum von 12 Wochen wurden acht Ratten und eine Ziege mit aufkonzentriertem Zellüberstand immunisiert (Kapitel 2.4.3). In Abständen von jeweils drei Wochen wurden die Tiere geblutet und immunisiert (Abb. 3.2).

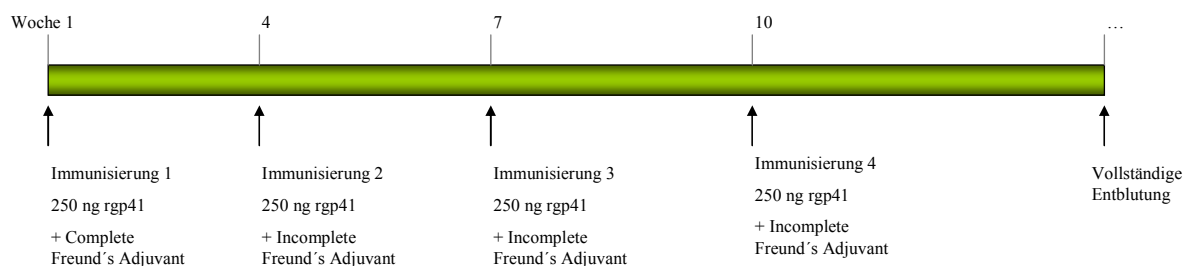


Abb. 3.2: Immunisierungsplan der Ratten und der Ziege

Die regelmäßige Immunisierung der Versuchstiere mit rgp41 induzierte eine spezifische Immunantwort der Versuchstiere gegenüber dem Protein. Es sollte festgestellt werden, ob durch die Induktion spezifische, womöglich neutralisierende Antikörper gegen rgp41 gebildet wurden. Zur serologischen Analyse wurden deshalb die Seren wie in den Kapiteln 2.4.2 vorbereitet und anschließend im Western Blot (Kapitel 2.4.5), Epitopmapping (Kapitel 2.4.6), ELISA (Kapitel 2.4.7) und Neutralisationstest (Kapitel 2.4.8) untersucht.

3.1.2.2 Nachweis gp41-spezifischer Antikörper im Western Blot

Durch die fortwährende Immunisierung der Versuchstiere mit rgp41 sollte eine Protein-spezifische Immunantwort induziert werden. Bereits nach der zweiten Immunisierung mit 250 ng rgp41 konnte die Bildung Antigen-spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert werden. Für die Analyse der Seren auf deren Reaktivität im Western Blot wurden bereits präparierte Western Blot-Streifen mit dem aufgetragenen Peptid T20 und den konzentrierten Zellüberständen von rgp41 und pNL4.3 verwendet. Die Ratten- und Ziegenserum wurden in einer Verdünnung von 1:200 bzw. 1:1000 (Positivkontrollen 2F5/ 4E10) eingesetzt. Durch die Inkubation dieser Teststreifen mit dem jeweiligen Serum bzw. mit positiven und negativen Kontrollen konnten im Blut gebildete Antikörper gegen das Antigen rgp41 detektiert werden (Abb. 3.3).

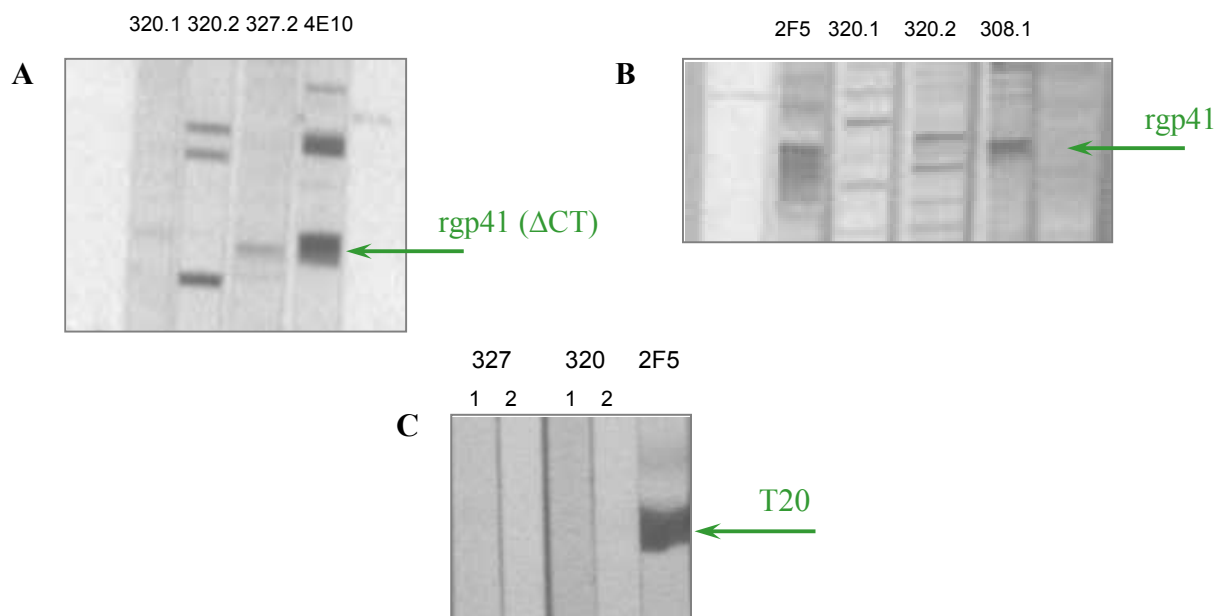


Abb. 3.3: Western Blot-Analyse der Seren immunisierter Wistar Ratten

A: Das Serum der Ratten 320.1, 320.2 und 327.2 und die Positivkontrolle 4E10 wurden gegen das rgp41 getestet. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Die Positivkontrolle 4E10 wurde in einem Verhältnis 1:1000 in 6 % Milchlösung verdünnt. **B:** Die Rattenserum 320.1, 320.2 und 308.1 wurden hier

3.1.2.3 Analyse der Epitope

Die Bindungsstellen der während der Immunantwort gebildeten Antikörper am Antigen können im Epitopmapping detektiert werden. Dabei kann die Lage der Epitope Aussage über die Reaktivität und damit über neutralisierende Eigenschaften der Seren treffen. Liegen die Epitope eines Serums nahe oder deckend mit den 2F5/4E10-Epitopen kann auch dieses Serum neutralisierende Eigenschaften zeigen. Nach der Analyse der Seren im Western Blot wurde auch das Vorhandensein möglicher Epitope überprüft. Hierzu wurden laborintern hergestellte und kommerzielle Epitopmappingmembranen verwendet. Die selbst gespotteten Peptide wurden wie folgt auf der Nitrocellulosemembran aufgebracht (Abb. 3.4). Die Peptide überlagerten sich jeweils um 4 Aminosäuren. Diese Aufreihung der Peptide fand sich auch auf den von JPT erworbenen Membranen.

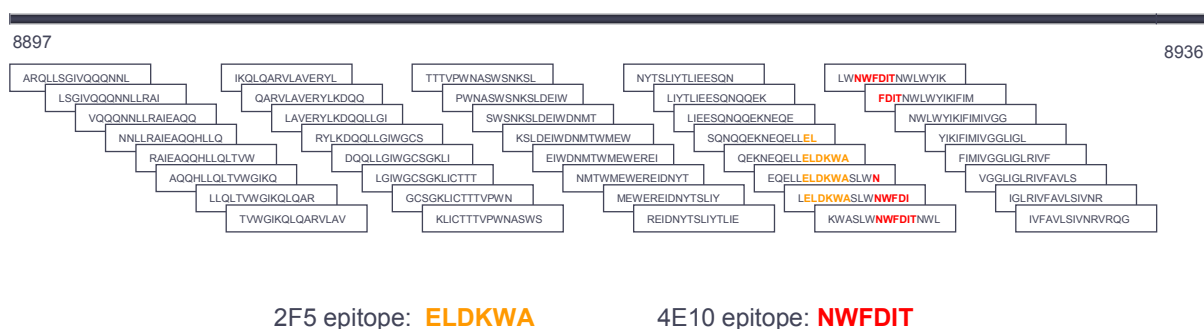


Abb. 3.4: Schematische Übersicht über die auf einer Nitrocellulosemembran gespotteten Peptide. Besonders gekennzeichnet (gelb, rot) sind die Epitope für die beiden humanen Antikörper- 2F5 und 4E10. Bei der Analyse der Seren im Epitopmapping wurden verschiedene Epitope detektiert. Die eindeutige Detektion eines Epitops ist durch drei aufeinander folgende Spots (kontinuierliche Epitope) oder mehreren auseinander liegenden Spots (diskontinuierliche Epitope)

charakterisiert. Bei den getesteten Seren konnten verschiedene Spots detektiert werden, lediglich bei dem Serum der 308.1 konnte das Epitop von 2F5 nachgewiesen werden (Abb. 3.5,C).

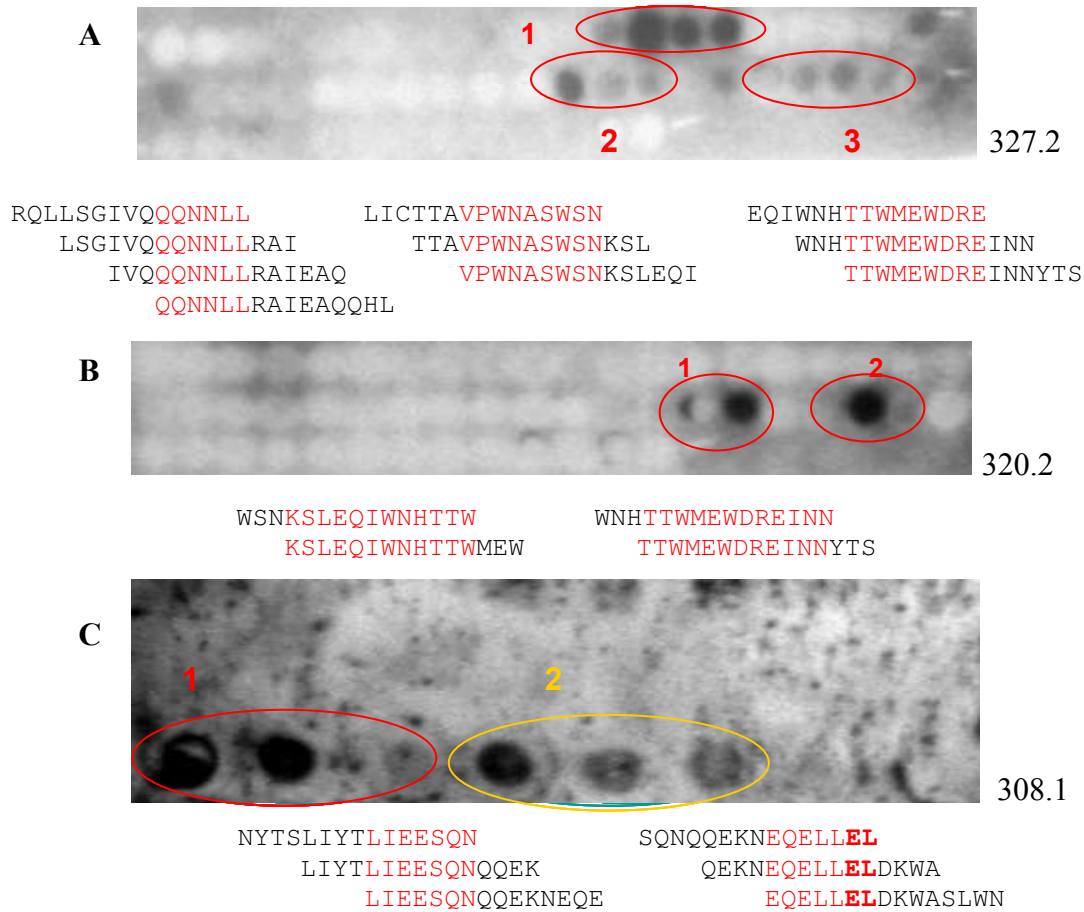


Abb. 3.5: Ergebnisse des Epitopmappings der Rattenserum

A: Mit einer kommerziellen Membran wurde das Serum der Ratte 327.2 getestet. Das Tier starb im späteren Verlauf durch die Nachwirkungen der Narkose. B: Das Serum der Ratte 320.2 wurde ebenfalls auf einer kommerziellen Membran der Firma JPT getestet und detektierte zwei Epitope mit großer Intensität. C: Das Rattenserum 308.1 detektierte das Epitop für 2F5.

Die Seren der Ratten 327.2 und 320.2 detektieren zwar verschiedene Sequenzen (Epitope), allerdings handelt es sich hierbei nicht um Epitope, an die bisher bekannte neutralisierende Antikörper binden. Die bisher bekanntesten Epitope, die durch neutralisierende Antikörper gebunden werden, sind die der Antikörper 2F5 und 4E10. Da das Serum der Ratte 308.1 positiv im Western Blot reagierte, sollten nun im Neutralisationstest dessen potentiellen neutralisierenden Eigenschaften untersucht werden. Auch alle anderen gewonnenen Seren der immunisierten Versuchstiere wurden im Neutralisationstest getestet. Neben dem Epitop für 2F5 konnte kein weiteres bisher bekanntes Epitop neutralisierender Antikörper detektiert

werden. Um die neutralisierenden Eigenschaften der Seren zu überprüfen, sollten diese im Neutralisationstest untersucht werden.

3.1.2.4 Analyse neutralisierender Seren im Neutralisationstest

Im Neutralisationstest wurden die Rattenserum in unterschiedlichen Verdünnungen auf TZM-bl Zellen getestet und diese mit pNL4.3 infiziert. Die durch das Virus infizierten Zellen wurden durch die Entwicklerlösung mit X-Gal blau gefärbt und konnten anschließend ausgezählt werden. Diese Methode ermöglichte die Detektion von neutralisierenden Antikörpern im Serum.

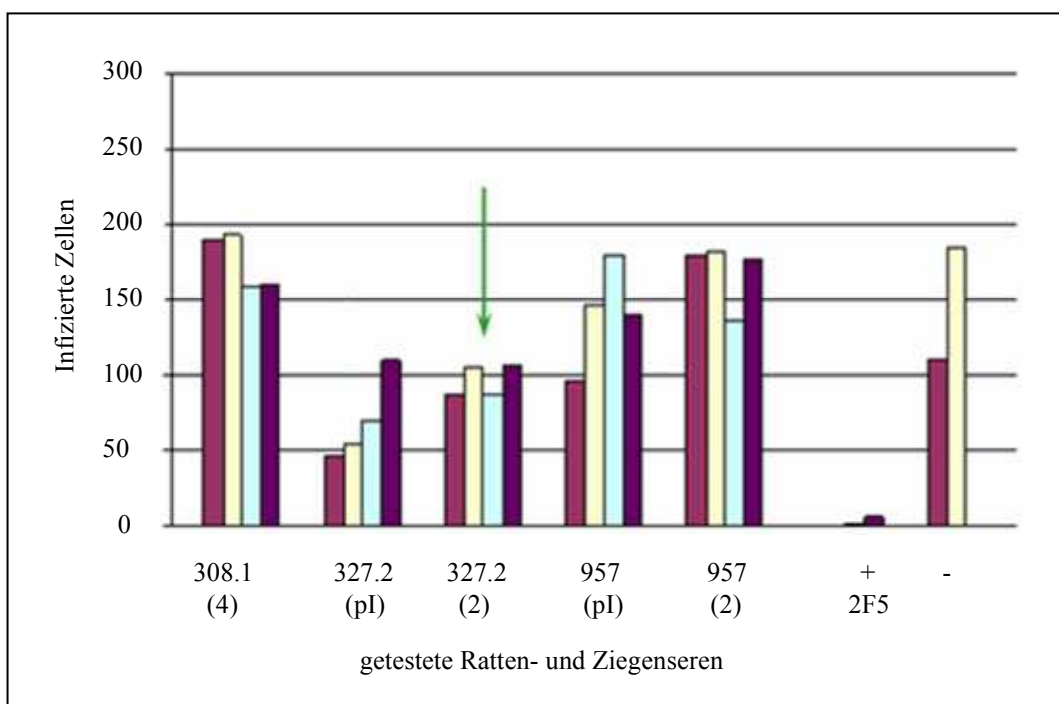


Abb. 3.6: Neutralisationstest mit den Seren der immunisierten Ratten und der Ziege

Das eingesetzte Serum wurde 2 bis 16fach verdünnt mit HIV-1_{pNL4.3} versetzt. Die eingetragenen Balken symbolisieren die einzelnen Verdünnungsstufen eines Serums beim Neutralisationstest.

Um neutralisierende Seren detektieren zu können, wurden als Vergleichswerte eine Positivkontrolle (2F5) und eine Negativkontrolle (Zahl der Durchinfektion durch HIV ohne Serumeinfluss) mitgeführt. Beim Vergleich der getesteten Seren mit den Negativkontrollen, konnte kein deutlicher Unterschied und damit keine eindeutige Neutralisation ausgemacht werden. Als viel versprechendes Serum wurde 308.1, nach der vierten Immunisierung (308.1(4)) untersucht. Es zeigte sich, dass zwar im Epitopmapping eine Detektion des Epitops für 2F5 erfolgte, es sich hierbei jedoch nicht um neutralisierende Antikörper handelte. Andernfalls hätte es im Neutralisationstest zu einer eindeutigen Reduzierung des Virus in den

einzelnen Verdünnungstufen kommen müssen. Bei der Betrachtung von 308.1 kann anhand der Werte, allerdings keine Neutralisation beobachtet werden (Abb. 3.6). Eine positive Reaktion, die Neutralisation des Virus durch das Serum würde sich im Diagramm als langsam aufsteigende Kurve von der ersten bis zur letzten Verdünnung des jeweiligen Serums darstellen. Wenn man das Prä-Immunserum (pI) von 327.2 mit dem Serum dieser Ratten nach der zweiten Immunisierung vergleicht (Abb. 3.6, grüne Pfeile), reagiert das präimmune Serum besser als das immunisierte Serum. Um eine Falschaussage der Serumreaktivität auszuschließen wurde in jedem Fall das Präimmunserum des jeweiligen Versuchstieres im Test mitgeführt. Im Fall der Ziege 957 konnte im Vergleich zum Prä-Immunserum keinerlei Neutralisation des Virus HIV-1_{pNL4.3} registriert werden.

Auch die anderen getesteten Rattenserum zeigten keine positive Reaktivität im Neutralisationstest. Meist konnten zwar geringe Reduktionen der infizierten Zellen beobachtet werden, allerdings kam es dann innerhalb der Verdünnungsstufen zu keiner Titration der Ergebnisse (Abb. 3.7). Eine eindeutige Neutralisation des Virus konnte durch die getesteten Seren nicht beobachtet werden. Obwohl bindende Antikörper im Serum durch die Analyse der Epitope detektiert wurden, konnten im Neutralisationstest keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden.

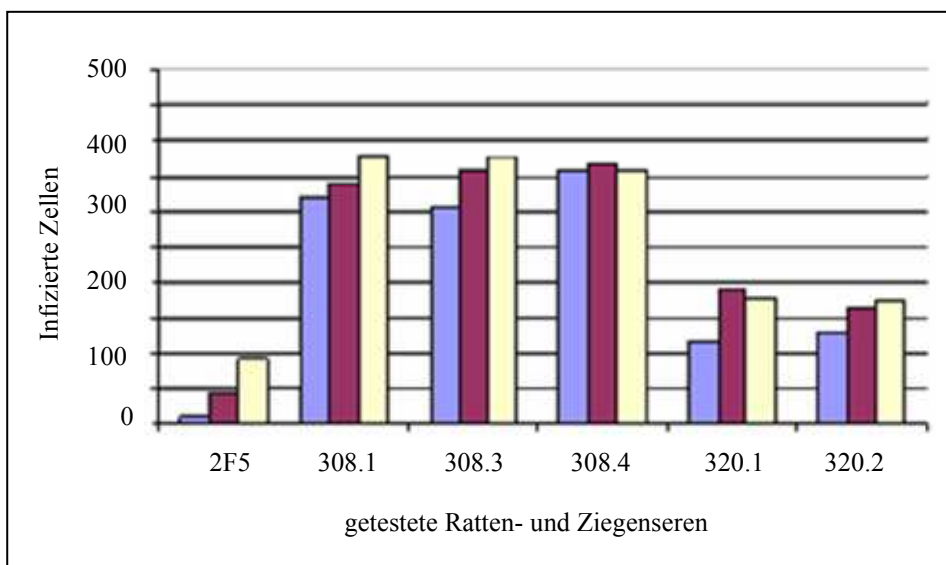


Abb. 3.7: Bestimmung der Neutralisationsaktivität verschiedener Rattenserum

Die eingetragenen Balken symbolisieren die einzelnen Verdünnungsstufen eines Serums beim Neutralisationstest.

3.2 Etablierung einer rgp41-produzierenden Zelllinie

3.2.1 Design und Schritte zur Etablierung einer permanent exprimierenden Zelllinie

Für die Etablierung einer permanent rgp41 exprimierenden Zelllinie mit den klonierten Vektorkonstrukten waren folgende Schritte erforderlich (Abb. 3.8). Nach der Transfektion der 293T-Zellen mit pTarget (Sequenz siehe Anhang) sollten in regelmäßigen Abschnitten Zelllysate hergestellt werden um im Tris-Glycine-Gel die Expression des rgp41 über einen Zeitraum von mehreren Tagen nachzuweisen. Für die Optimierung der Expressionsausbeute sollten die transfizierten Zellen anschließend in Zellkulturmedium mit Antibiotika selektiert werden. Hierdurch sollten exprimierende von nicht exprimierenden Zellen abgetrennt werden.

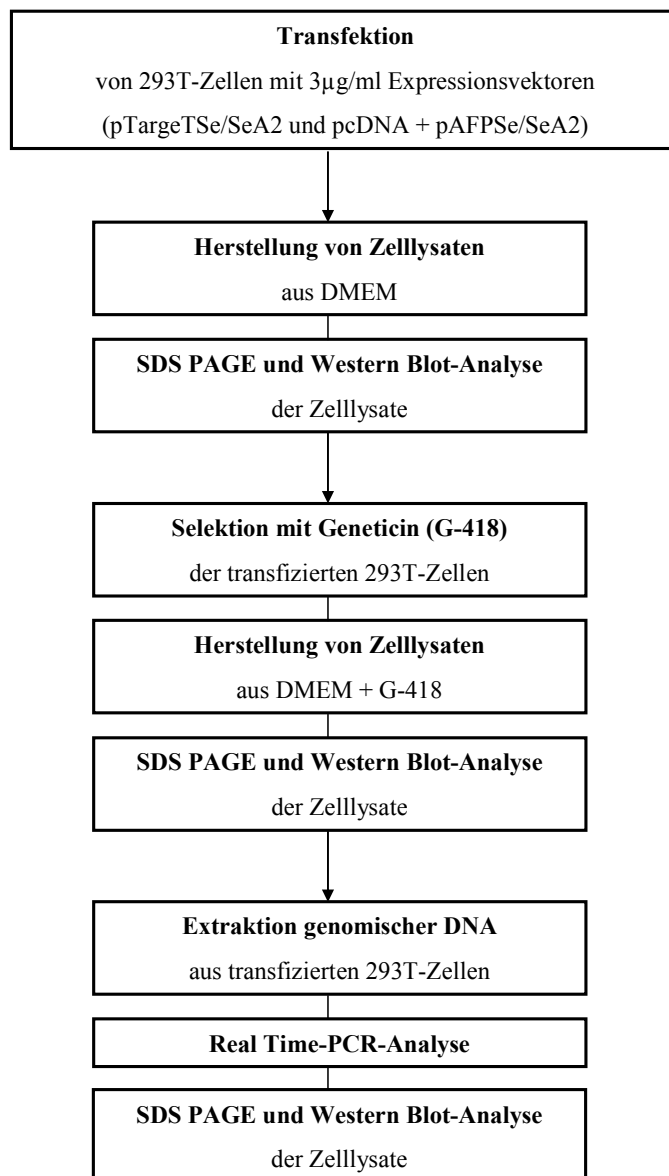


Abb. 3.8: Notwendige Schritte zur Etablierung einer Zelllinie

3.2.2 Klonierung eines neuen Vektors zur Expression des rgp41

Auf Grund der fehlenden Neomycin-Resistenz des vorher zur Antigen-Produktion verwendeten Vektors pcDNASeA2, konnte dieser nicht zur Selektion verwendet werden. Deshalb musste für die Expression des rgp41 ein neues Vektorkonstrukt gefunden werden. Es wurde der Vektor pTargetT genutzt, welcher unter Verwendung des Antibiotika Geneticin (G-418) die später gentisch veränderten Zellen selektierte. Geneticin findet insbesondere in der Zellbiologie zur Selektion stabil transfizierter eukaryotischer Zellen Anwendung. Hierbei wird einerseits die Zelltoxizität des Geneticins für eukaryotische Zellen und andererseits die Möglichkeit der intrazellulären Geneticininaktivierung durch Einschleusung eines Neomycin-Geneticin-Resistenzgens (Neo^r) ausgenutzt (DAVIS *et al.*, 1980).

Die neuklonierten und in *Escherichia coli* vermehrten Vektoren wurden zur Überprüfung der Richtigkeit des Inserts mit *Eco*RI restringiert und in einem 1,2 % Agarosegel analysiert (Abb. 3.9). Dabei lief der geschnittene pTargetT-Vektor bei 5500 kb und das ausgeschnittene Insert bei etwa 800 kb im Gel. Als Vergleich wurden der ungeschnittene Vektor in der Laufspur Nummer 10 und ein 1 kb DNA Marker (M) zur Größenbestimmung mitgeführt.

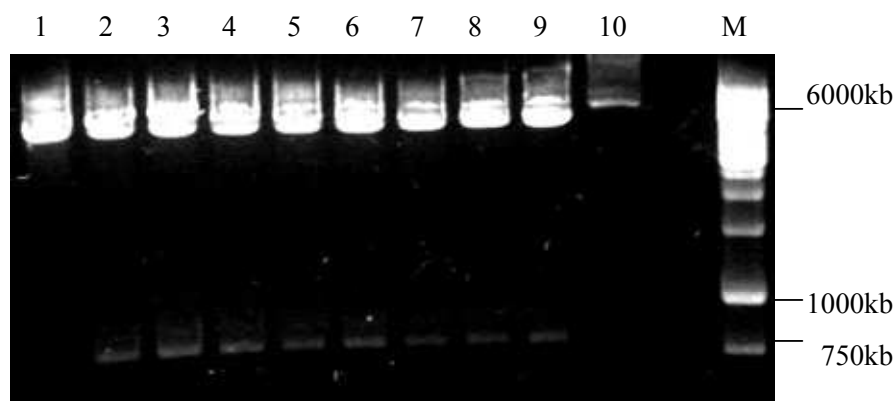


Abb. 3.9: geschnittenes Insert der Restriktion von pTargetTSe und pTargetSeA2

M - O'Gene Ruler 1kb DNA Ladder	5 - pTargetTSe cl.5
1 - pTargetTSe cl.1	6 - pTargetTSeA2 cl.1
2 - pTargetTSe cl.2	7 - pTargetTSeA2 cl.2
3 - pTargetTSe cl.3	8 - pTargetTSeA2 cl.3
4 - pTargetTSe cl.4	9 - pTargetTSeA2 cl.4
10 - pTargetT (ungeschnitten)	

In acht der neun aufgetragenen Vektoren konnte im Gel ein Insert richtiger Größe nachgewiesen werden. Lediglich der Vektor in Laufspur Nummer 1 beinhaltet kein Insert für die Expression des rgp41. Die bei der Restriktion positiv getesteten Klone des pTargetT-Vektors wurden nochmals sequenziert und die richtige Eingliederung des Inserts in den Vektor bestätigt, welche die Voraussetzung für die Funktionalität des Konstruktes war. Die

Unterschiede innerhalb der Vektorsysteme ergaben sich durch eine einzige Aminosäure. Eine bewusst herbeigeführte Punktmutation innerhalb der Sequenz der Ectodomäne des viralen Glykoproteins gp41 von HIV-1 wurden zwei verschiedene Ausgangskonstrukte hergestellt. Die Restriktion dieser Konstrukte mit *EcoRI* und die Überführung des geschnittenen Inserts in das Vektorsystem pTarget ermöglichten die Entstehung von zwei neuen Expressionssystemen. Diese Expressionsvektoren unterschieden sich lediglich in einer einzigen Aminosäure und hießen pTargetSe und pTargetSeA2 (Abb. 3.10). Der Austausch der Aminosäure Glutamin (Q) durch Alanin (A) beeinflusste die immunsuppressiven Eigenschaften des rgp41. Strukturell betrachtet werden beide Heptat Repeat-Stränge des gp41 durch eine mit Disulfidbrücken stabilisierte Schleife (loop) verbunden. Da besonders diese Region von den meisten Seren HIV-positiver Patienten detektiert wird, wird sie als „immundominante Domäne“ bezeichnet (SANTOS *et al.*, 1998; DENNER *et al.*, 1994). Durch den Austausch der zweiten Aminosäure (A2) der Domäne sollte der Einfluss eines immunsuppressiven Proteins im Unterschied zu einem nicht-immunsuppressiven Protein untersucht werden. Durch die zwei Vektoren war es möglich ein immunsuppressives und ein nicht-immunsuppressives Protein zu produzieren und deren Einfluss auf die Immunantwort der immunisierten Tiere zu untersuchen.

Abb. 3.10: Unterschied in der Sequenz von gp41 in den Expressionsvektoren pTargetSe und pTargetSeA2 (rote Umrandung)

3.2.4 Expression von rgp41 nach Transfektion von 293T-Zellen

Die zuvor durch die Sequenzierung bestätigten Klone der zwei Vektorsysteme wurden zur Transfektion von 293T-Zellen in der Zellkultur verwendet. Als Vergleichskonstrukte für die Expression des rekombinanten gp41 wurde eine Co-Transfektion des Ausgangsvektors pCLneo und der Vektoren pcDNASe bzw. pcDNASeA2 vorgenommen. Für die Selektionsversuche standen nun vier unterschiedliche Expressionssysteme zur Verfügung. Hierfür wurden 293T-Zellen wie unter 2.2.7 beschrieben wie folgt transfiziert:

- pCLneo + pcDNASe
- pCLneo + pcDNASeA2
- pTargetSe
- pTargetSeA2.

Die transfizierten Zellen wurden zwei Tage später lysiert (Kapitel 2.2.8.1) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blot der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran im Western Blot-Verfahren wurde die Membran mit dem humanen Antikörper 2F5 inkubiert, der die Proteine auf dem Blot charakterisieren sollte. Direkt nach der Transfektion konnte das von den Zellen exprimierte gp41 detektiert werden (Abb. 3.11).

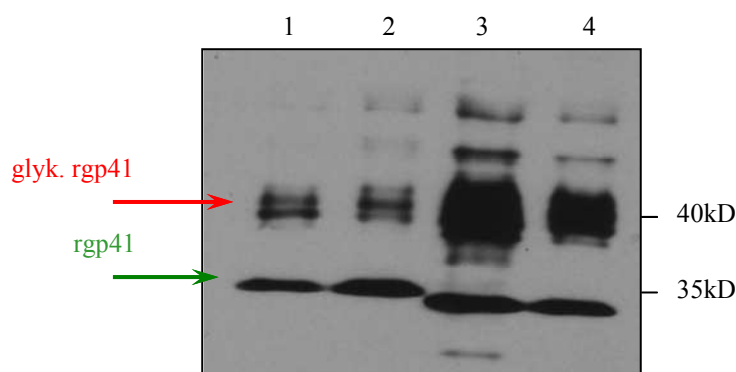


Abb. 3.11: 293T-Zellen exprimieren 2 Tage nach der Transfektion das rekombinante Hüllprotein gp41

1	pCLneo + pcDNASe	2	pCLneo + pcDNASeA2
3	pTargetSe	4	pTargetSeA2

Im Gel wurden Zelllysate der transfizierten 293T-Zellen aufgetragen. * geringfügiger Größenunterschied innerhalb der Banden, da der Vektor pTargetT noch Teil des Fusionspeptides beinhaltet (Pfeile)

Eine Expression des rekombinanten gp41 wurde in allen vier Fällen der unterschiedlichen Expressionskonstrukte induziert. Durch die Detektion mit dem 2F5-Antikörper wurden zwei Formen des 17 kD großen rgp41 detektiert. Die Vektorkonstrukte pTargetSe und pTargetSeA2 zeigten eine wesentlich höhere Expression des Proteins. Der rote Pfeil kennzeichnet das Vorhandensein der glykolysierten Form des rgp41. Der grüne Pfeil

kennzeichnet die nicht-glykolysierte Form des exprimierten *rgp41*. Bei jedem der eingesetzten Vektoren konnte die Expression des *rgp41* im Western Blot 2 Tage nach der Transfektion nachgewiesen werden.

3.2.5 Ergebnisse der Selektion mit Geneticin (G-418)

Zur weiteren Selektion der transfizierten und exprimierenden Klone wurde das Antibiotikum Geneticin (G-418) (Abb. 3.12) ausgewählt. Durch ein Resistenzgen auf dem transfizierten Plasmid, ermöglichte die Zugabe von G-418 eine Selektion der exprimierenden Zellen. Über einen Zeitraum von vier Wochen nach der Transfektion in Selektionsmedium wurden in regelmäßigen Abständen Zelllysate (Kapitel 2.2.8.1) hergestellt. Bei der Analyse dieser zellulären Lysate im Western Blot (Kapitel 2.2.9, 2.2.10) konnte zu Beginn der Selektion eine große Menge *rgp41* detektiert werden, doch bereits nach 3 Wochen im Selektionsmedium kam es zum vollständigen Fehlen der Expression (Abb. 3.13).

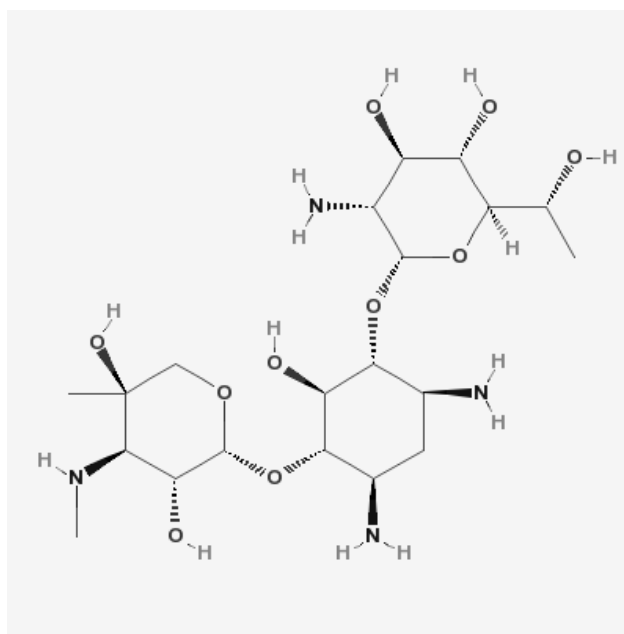


Abb. 3.12: Struktur des Antibiotikums Geneticin (G-418) [PUBCHEM, 2010]

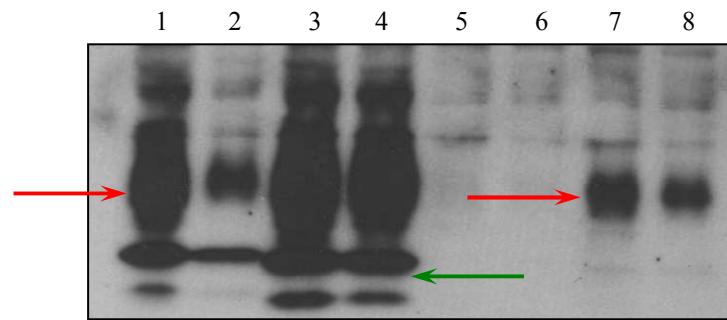


Abb. 3.13: Analyse der rgp41 Expression innerhalb von einer Woche

1/2 und 5/6 - pCLneo + pcDNase/SeA2 ; 3/4 und 7/8 - pTargeTSe/SeA2 Von beiden Konstrukten wurden Zelllysate in einem Abstand von einer Woche präpariert und im Gel aufgetragen (glykolysierte Form des rgp41 (roter Pfeil); nicht-glykolysierte Form des rgp41 (grüner Pfeil))

Eine Woche nach Beginn der Selektion der exprimierenden Klone in Medium mit Geneticin (G-418) kam es zur Einstellung der Expressionsleistung durch die Zellen. In den gewonnenen Zelllysaten konnte nur noch wenig rgp41 detektiert werden.

Von den Zellen, die mit den vier Vektorkonstrukten transfiziert wurden, konnten insgesamt 60 Klone mittels Überführung von transfizierten Zellen mit Filterpapier gewonnen und in Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen Geneticin kultiviert werden.

Die Untersuchung der Zelllysate auf Expression des rgp41 zwei Wochen später ergab keine Produktion. Bei allen Klonen konnte kein rgp41 detektiert werden (Abb. 3.14). Die einzige positive Reaktion zeigt die mitgeführte Kontrolle pcDNaseA2 (+).

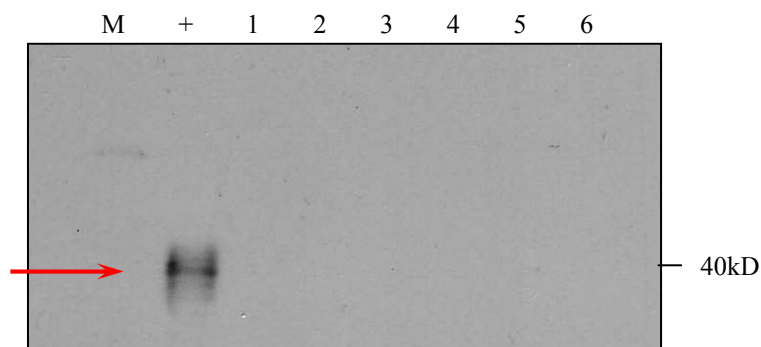


Abb. 3.14: Western Blot-Analyse der Zelllysate selektierter Zellen zwei Wochen nach Transfektion

M - O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

+ - pcDNaseA2

1 - 6: Klone der 600 µg/ml G-418-Selektion

(lediglich in der positiven Kontrolle (pcDNaseA2) war rgp41 detektierbar (roter Pfeil); die Membran wurde zur Auswertung mit 2F5-Antikörpern inkubiert)

Zwei Wochen nach der Transfektion und beginnenden Selektion mit Geneticin wurde ein vollständiger Stop der Expression des *rgp41* bei den selektierten Klonen nachgewiesen. Neben einer Positivkontrolle (+; pcDNaseA2) wurden repräsentativ für die restlichen 54 Klone sechs Klone (1-6) im Gel und Western Blot analysiert.

Überraschenderweise konnte keine Produktion des *rgp41* nachgewiesen werden. Möglicher Grund hierfür konnte der Verlust der *gp41* codierenden Sequenz sein, die die Zellen auf Grund des wirkenden Selektionsdruckes wieder ausgeschleusst haben. Um zu überprüfen, ob virale DNA, in Form der Plasmide in den selektierten Klonen vorlag oder es zum Verlust dieser Fremd-DNA kam, wurde eine Real Time-PCR durchgeführt.

Die Western Blot-Analyse der Zelllysate der über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen selektierten Klone zeigte die Inhibierung der Expression des *rgp41*.

3.2.6 Nachweis des viralen Genoms in selektierten Zellklonen durch Real Time-PCR

Um das Vorhandensein des Expressionsvektors bzw. integrierter viraler DNA in den transfizierten Zellen zu analysieren, wurde eine Real Time-PCR mit einer Auswahl zur Zielsequenz des *gp41* korrespondierender DNA-Fragmente (Primer; F68/ R69) durchgeführt. Für die Analyse wurde aus den transfizierten 293T-Zellen mittels des Qiagen Blood & Tissue Kits genomische DNA von 60 selektierten Klonen extrahiert und deren Reinheit in einem 1,5 % Agarosegel bestimmt (Abb. 3.15).

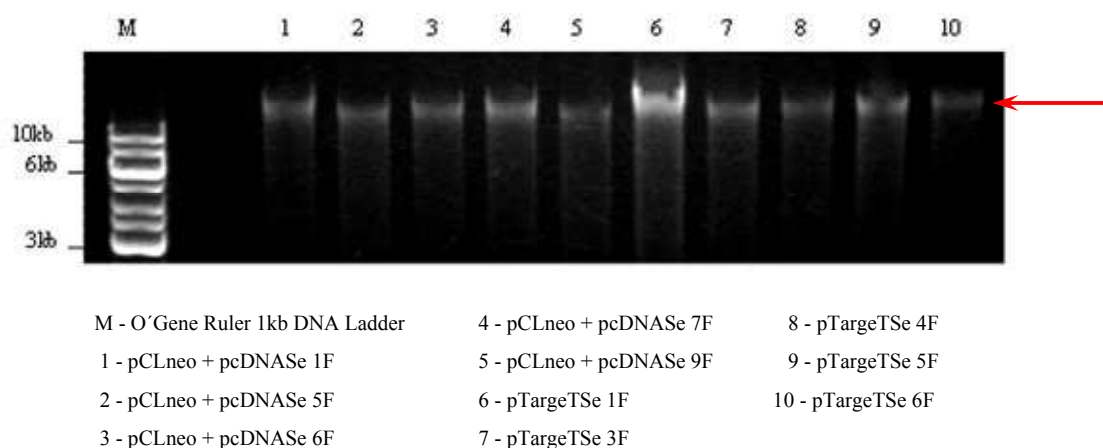


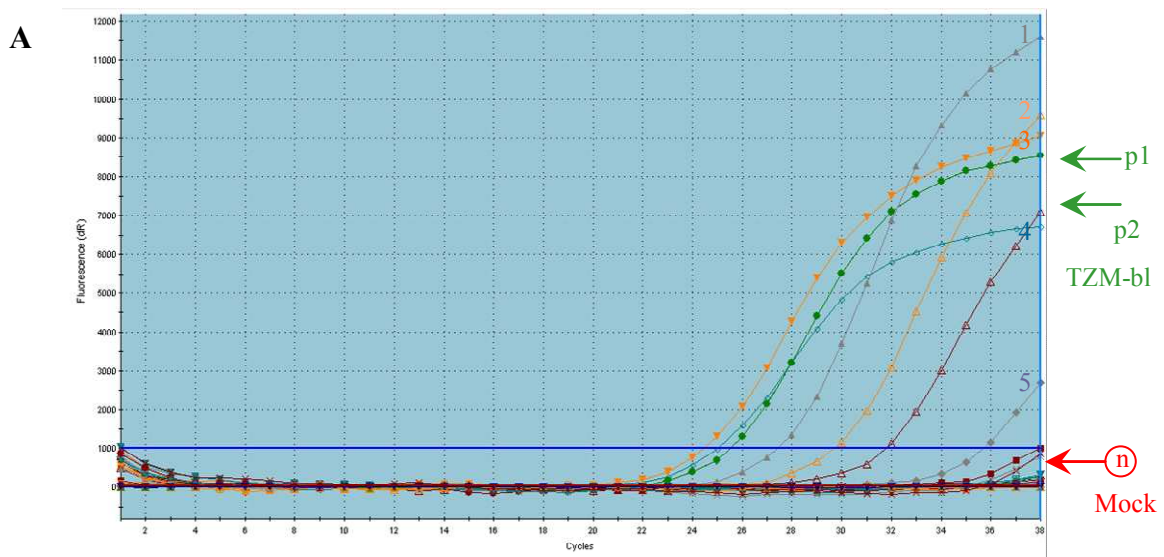
Abb. 3.15: Repräsentative Analyse der extrahierten DNA aus den Klonen der G-418-Selektion (600 µg/ml) Vor dem Ansetzen der RT-qPCR mit den potentiell-positiven Klonen wurden jeweils 100 ng der extrahierten DNA im Agarosegel aufgetragen um deren Konzentrationen bzw. Reinheiten zu analysieren (roter Pfeil zeigt die genomische DNA der aufgetragenen Proben); im Bild handelt es sich lediglich um eine Auswahl aus insgesamt

60 getesteten Klonen; Die Bezeichnung 'F' deutet auf die Überführung des Klones durch Filterpapier in neues Selektionsmedium.

Im Gel wurden jeweils 100 ng DNA mit einem 1 kb DNA Marker aufgetragen. Da die Qualität der extrahierten DNA für die weitergehende Analyse geeignet war, wurden wie im Gel aufgetragen 100 ng je Probe für die Detektion der viralen Sequenz in der Real Time-PCR genutzt. Die Real Time-PCR ist eine sehr sensitive Methode zur Erfassung bereits geringster DNA-Fragmente in einer Probe. Ein normaler PCR-Ansatz wurde hier zusätzlich mit einer HIV-Sonde versetzt, die während der Amplifikation der DNA ein vom Gerät eingeworfenes Licht je nach Menge der vorhandenen amplifizierten DNA wieder zurückwirft. Die Menge dieses Lichtes wird dann in einen *cycle threshold*-Wert (CT-Wert) der Probe umgerechnet.

Der CT-Wert ist ein Maß für die Menge der gesuchten DNA, die in der Probe vorliegt. Umso geringer der CT-Wert, desto mehr gesuchte DNA, in diesem Fall virale DNA ist in der Probe bzw. in der Zelle vorhanden. Beispielhaft für die Analyse aller 60 Klone in der Real Time-PCR wurden nachfolgend einige Klone aus der Geneticin-Selektion (600 µg/ml) mit den ermittelten CT-Werten im Diagramm aufgezeigt. In Abbildung 3.16/A sind fünf der selektierten Klone und deren im Lauf aufgenommenes Fluoreszenzsignal gegen den CT-Wert abgetragen. Als Vergleichswerte wurden Mock (rot), genomische DNA nicht-transfizierter 293T-Zellen als Negativkontrolle und zweifach genomische DNA von TZM-bl-Zellen (50 ng/ 100 ng) als Positivkontrollen mitgeführt. Die DNA von TZM-bl-Zellen diente als positive Kontrolle, da diese Zellen mit viralen Sequenzen modifiziert wurden. Als zusätzliche Kontrollen zur Überprüfung der Funktionalität des Systems wurde reines Wasser und Wasser mit Reaktionsansatz als weitere Negativwerte mitgeführt.

In Abbildung 3.16/B sind die in der Real Time-PCR getesteten Proben mit ihren CT-Werten und den eingesetzten Konzentrationen aufgelistet.



B	Nr. Probe	DNA-Menge	CT-Wert
	1 pTargetSe 3F	100ng	27,46
	2 pTargetSe 1F	100ng	29,74
	3 pcDNA + pAFPS _e 5F	100ng	24,51
	4 pTargetSe 6F	100ng	31,81
	5 pTargetSe 5F	100ng	35,76
	n Mock	100ng	no CT
	p ¹ TZM-bl	50ng	25,57
	p ² TZM-bl	100ng	25,02

Abb. 3.16: Repräsentative Ergebnisse der genomischen DNA der 600 µg/ml G-418-Selektion

A: Nach 4 Tagen unter Selektionsbedingungen in 600 µg/ml G-418 wurden die ersten 20 Klone in der Real Time-PCR getestet. Als Referenzen sind eine Negativkontrolle (Mock, n - negativ) und zwei Positivkontrollen (TZM-bl, 100 ng DNA, 50 ng DNA, p - positiv) mitgelaufen. **B:** CT-Wert der jeweils amplifizierten Proben-DNA (die Bezeichnung 6F steht für den durch Filter gewonnenen Klon des Vektors pTargetT mit *short env* (Se))

Um amplifizierte DNA nachzuweisen, wurden die Proben nach der Real Time-PCR in 1,5% Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.17). Allein die Auswertung der erzielten CT-Werte der Real Time-PCR gab keinen Aufschluss darüber, ob kurze oder lange DNA-Fragmente oder sogenannte *mismatches* durch falsche Interaktion der Primer gebildet wurden. Bei der Analyse im Agarosegel konnte diese Unterscheidung getroffen werden.

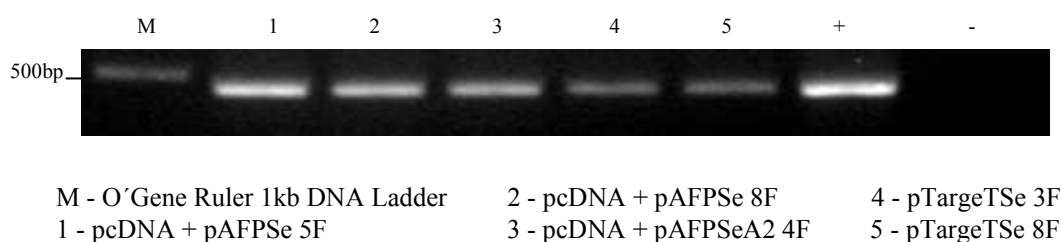


Abb. 3.17: Nachweis amplifizierter Proben-DNA nach der Real Time-PCR

Nach dem Lauf der Real Time-PCR wurden die Proben nochmals im 1,5 % Agarosegel analysiert. (im Gel wurden jeweils 10µl der Real Time-Proben aufgetragen (90 V, 45 min))

Auch bei der Real Time-PCR wurden von allen 60 positiven Zellklonen die Lysate analysiert (Tab. 3.1).

Ergebnisse

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Analyse aller selektierten Zellkulturklone in der Real Time-PCR (Bulk bezeichnet alle nach der Transfektion vorliegenden Zellen; positive Klone sind grün hervorgehoben)

Klon		CT		Klon		CT	
pCL _{neo} + pcDNase	600µg/ml G-418Bulk	32,7		pCL _{neo} + pcDNaseA2	600µg/ml G-418Bulk	29,8	
	pSe 6.1F	38,0	No CT		pSeA2 6.1F	36,4	
	pSe 6.2F	No CT			pSeA2 6.2F	38,0	
	pSe 6.3F	35,9			pSeA2 6.3F	37,6	
	pSe 6.4F	38,7			pSeA2 6.4F	26,9	
	pSe 6.5F	24,4	24,5		pSeA2 6.5F	35,2	
	pSe 6.6F	36,3	No CT		pSeA2 6.6F	No CT	
	pSe 6.7F	37,5	No CT		pSeA2 6.7F	38,5	
	pSe 6.8F	27,1			pSeA2 6.8F	38,3	
	pSe 6.9F	39,3	No CT		pSeA2 6.9F	No CT	
	pSe 6.10F	37,4			pSeA2 6.10F	No CT	
pCL _{neo} + pcDNase	800µg/ml G-418Bulk	29,1		pCL _{neo} + pcDNaseA2	800µg/ml G-418Bulk	30,0	
	pSe 8.1F	x			pSeA2 8.1F	32,3	
	pSe 8.2F	x			pSeA2 8.2F	37,3	
	pSe 8.3F	x			pSeA2 8.3F	35,8	
	pSe 8.4F	x			pSeA2 8.4F	35,0	
	pSe 8.5F	x			pSeA2 8.5F	36,5	
pTargetSe	600µg/ml G-418Bulk	25,6		pTargetSeA2	600µg/ml G-418Bulk	28,6	
	pTSe 6.1F	31,6	29,74		pTSeA2 6.1F	32,0	
	pTSe 6.2F	30,7			pTSeA2 6.2F	No CT	
	pTSe 6.3F	29,2	27,46		pTSeA2 6.3F	35,4	
	pTSe 6.4F	No CT	No CT		pTSeA2 6.4F	No CT	
	pTSe 6.5F	37,7	35,76		pTSeA2 6.5F	29,3	
	pTSe 6.6F	33,1	31,81		pTSeA2 6.6F	31,0	
	pTSe 6.7F	36,4			pTSeA2 6.7F	30,1	
	pTSe 6.8F	29,3			pTSeA2 6.8F	26,2	
	pTSe 6.9F	25,8			pTSeA2 6.9F	31,3	
	pTSe 6.10F	29,5			pTSeA2 6.10F	36,2	
pTargetSe	800µg/ml G-418Bulk	28,1		pTargetSeA2	800µg/ml G-418Bulk	27,1	
	pTSe 8.1F	17,4			pTSeA2 8.1F	17,7	
	pTSe 8.2F	21,6			pTSeA2 8.2F	18,9	
	pTSe 8.3F	23,0			pTSeA2 8.3F	20,5	
	pTSe 8.4F	28,9			pTSeA2 8.4F	19,0	
	pTSe 8.5F	34,7			pTSeA2 8.5F	17,6	
KONTROLLEN							
	H ₂ O	No CT			TZM-bl	25,1	
	Mock	No CT				24,8	

Die grün gekennzeichneten Zellklone wurden auf Grund der CT-Werte als positiv eingestuft. Im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen wurden in den analysierten Klonen auf Grund niedriger CT-Werte nach Definition große Mengen viralen Genoms nachgewiesen. Abschließend wurden durch die Real Time-PCR 20 von 60 untersuchten Klonen als positiv detektiert. Diese Klone wurden in verschiedenen Zellkulturmedien weiter selektiert. Sowohl in elf Klonen der 600 µg/ml G-418- und in neun Klonen der 800 µg/ml G-418-Selektion konnten große Mengen der gesuchten Sequenz nachgewiesen werden. Für fünf dieser als positiv detektierten Klone konnte die erneute Expression des *rgp41* nachgewiesen werden.

3.2.7 Schritte zur Expressionsoptimierung

Bei der Analyse der *rgp41* exprimierenden Zellkulturklone kam es nach kurzer Kultivierung in Medium (DMEM + FKS) mit Geneticin zum Stop der Expression. Grund hierfür könnte die Methylierung der im Vektor vorliegenden Gensequenz sein, welche viele Organismen zur eigenen Genregulation nutzen. Methylierte CpG-Sequenzen können durch die Zugabe bestimmter Reagenzien beeinflusst werden. GÖTZINGER *et al.* (1996) verwendete 5-Azacytidin und n-Butyrat (Abb. 3.18) zur Aktivierung humaner endogener Retroviren.

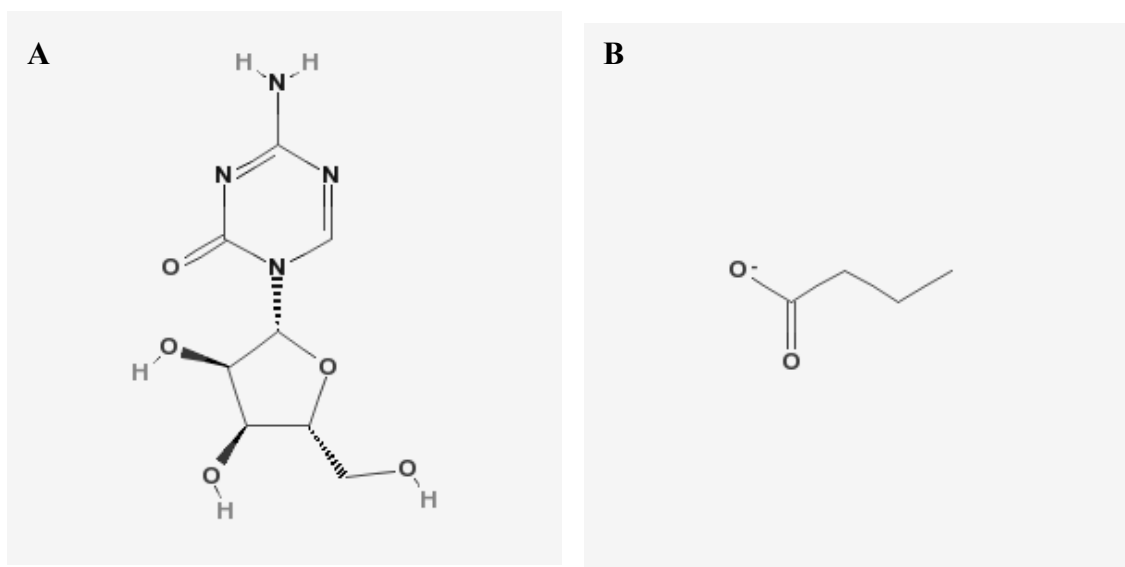


Abb. 3.18 Struktur der Demethylasen 5-Azacytidin (A) und n-Butyrat (B) [PUBCHEM2; PUBCHEM3]

Um zu untersuchen, ob es zur Methylierung und damit zur gesteuerten Herunterregulation der Gensequenzen für die *rgp41* Produktion gekommen war, wurden die transfizierten 293T-Zellen mit 5-Azacytidin behandelt werden (Abb. 3.19).

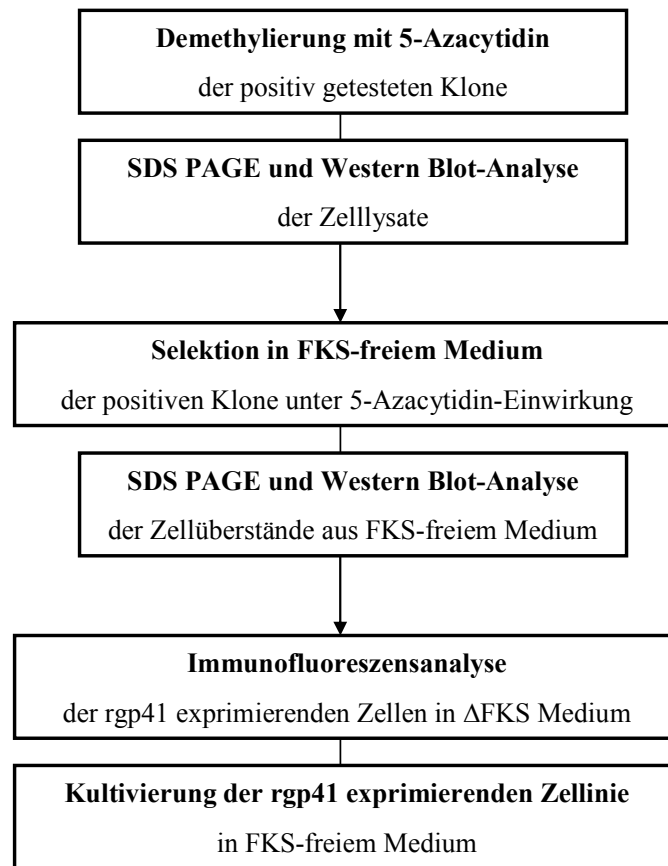


Abb. 3.19: Vorgehensweise für die permanente Expression von rgp41

3.2.8 Demethylierung der Zellklone mit 5-Azacytidin

Da es trotz vorhandener viraler Sequenzen in den selektierten Zellen zu einer verminderten Expression des rgp41 kam, was auf eine Methylierung der codierenden Sequenz zurück geführt werden könnte, wurden wie durch zur Aufhebung der Methylierung der Sequenzen des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K) 5-Azacytidin und n-Butyrat (Abb. 3.18) bei 293T-Zellen in der Zellkultur eingesetzt. Die Vorversuche mit einer höheren Konzentration des 5-Azacytidine zeigten eine stark induzierte Apoptose und ein Großteil der bereits positiv getesteten Zellen starben ab. GÖTZINGER *et al.* (1996) beschrieb 72 Stunden als optimale Inkubationszeit für 5-Azacytidin. Im vorliegenden Fall traten allerdings bereits nach etwa 42 bis 48 Stunden erhebliche Einschränkungen für das Zellwachstum auf. Um diesen Prozess zu regulieren und die Zellen womöglich besser an die neuen Selektionsbedingungen anzupassen, wurden nur 0,1 mg 5-Azacytidine im Zellkulturmedium eingesetzt. Um die Methylierung der Sequenz des rgp41 abzubauen, wurden die positiv

getesteten transfizierten Zellen für 42 Stunden in DMEM mit 5-Azacytidin bei 37°C inkubiert. Etwa alle 24 Stunden wurde das Medium mit frisch angesetztem 5-Azacytidin ausgetauscht. Anschließend wurden erneut Zelllysate hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran gebracht. Nach Inkubation der Membran mit dem humanen Antikörper 2F5 und dem Zweitantikörper Anti-Human IgG wurde die Expression des rgp41 detektiert (Abb. 3.20).

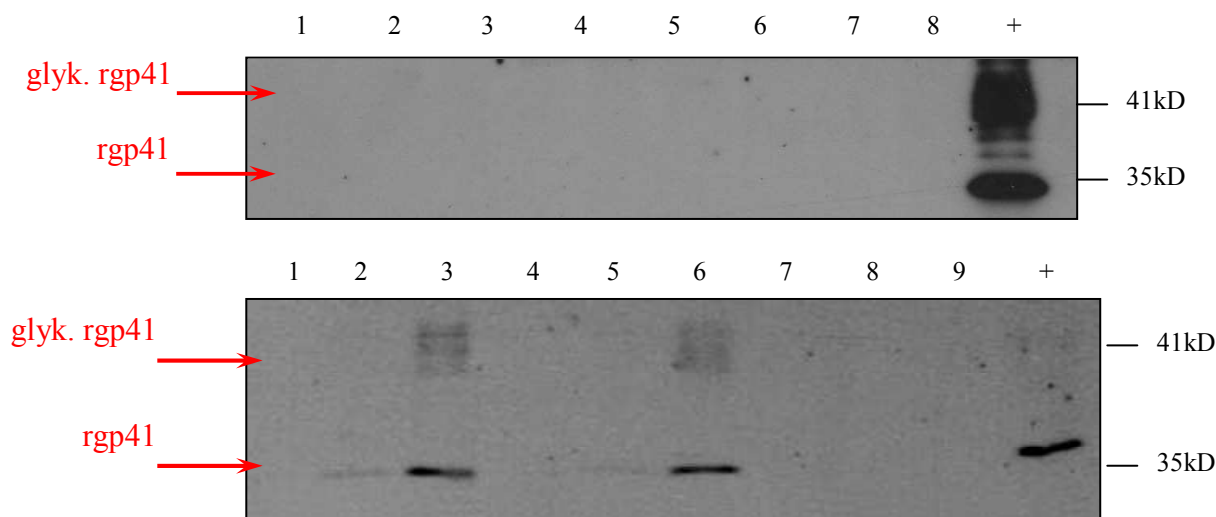


Abb. 3.20: Nachweis der rgp41 Expression in transfizierten Zellen unter Einwirkung von 5-Azacytidin

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 1 - pTargetSeA2 8F | 2 - pTargetSeA2 7F |
| 3 - pTargetSeA2 5F | 4 - pTargetSe 9F |
| 5 - pTargetSe 8F | 6 - pTargetSe 3F |
| 7 - pCLneo + pcDNASeA2 4F | 8 - pCLneo + pcDNA Se 8F |
| 9 - pCLneo + pcDNASe 5F | + - pAFPSA2 Lysat |

Im 4-20 % Tris-Glycine SDS Gel wurden Zelllysate von 9 positiv getesteten Klonen nach einer Inkubation von 48 Stunden in Medium mit 5-Azacytidin (zweites Gelbild) aufgetragen. Die Detektion der Western Blot-Membranen erfolgte mit dem 2F5 Antikörper.

Durch die Zugabe von 5-Azacytidin zum Zellkulturmedium konnte die Expression des rekombinanten gp41 in fünf von neun Klonen erneut nachgewiesen werden. Die Expression konnte jeweils nur in den Klonen mit dem pTarget-Expressionsvektor gezeigt werden, hingegen nicht in den pCLneo + pcDNASe/SeA2 co-transfizierten Zellen. Es wurde sowohl glykosyliertes, als auch nicht glykolysiertes Protein im Gel detektiert. Ob das Protein auch in das Medium sezerniert wurde, wurde in den folgenden Versuchen geklärt. Wichtig war hierbei die Verwendung von FKS-freiem Medium. Das im Medium vorliegende Albumin (FKS) behinderte ein Aufkonzentrieren und damit eine Nutzung des produzierten Proteins als Antigen in der Immunisierung.

3.2.9 Nachweis der Expression von gp41 mittels Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung der Expressionsausbeute der in serumfreiem Medium selektierten Zellen wurden diese auf mit Lysin (Poly- L) beschichtete Deckgläschen überführt und für 2 Tage bei 37°C in DMEM kultiviert. Nach zwei Tagen und ausreichendem Zellwachstum wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse vorbereitet (Kapitel 2.2.11). Durch die Zugabe von Triton-X zum Waschpuffer wurde der Zellaufschluss ermöglicht. Dadurch war es möglich, eine Färbung aller Proteine und Kompartimente im Zellinneren zu realisieren.

Sowohl im Inneren und im Besonderen auf der Zelloberfläche konnte das Protein gp41 detektiert werden (Abb. 3.21). Im Zellinneren lag das rgp41 in großen Ansammlungen in Vesikeln vor, teilweise waren die Zellen sogar fast vollständig mit Protein ausgefüllt. Diese starke Produktion ist zwar für die spätere Zelllinie wünschenswert, kann aber theoretisch zum Tod der Zelle führen, da essentielle zelluläre Syntheseprozesse unterbunden werden könnten.

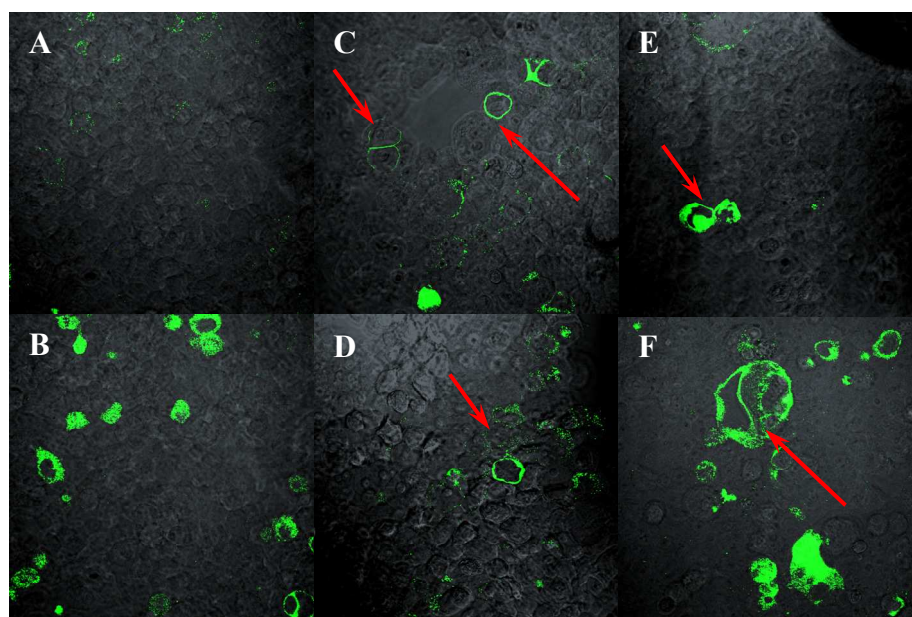


Abb. 3.21: Nachweis der Expression von rgp41 mittels Immunfluoreszenzaufnahmen Protein exprimierender Klone

A: negative Kontrolle: nicht-transfizierte 293T-Zellen (Die Hintergrundsignale wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Präparate untereinander reduziert) **B:** pTargetSeA2 6.8F: eine Vielzahl von rgp41 gefüllten Vesikeln waren zu erkennen **C:** pTargetSe 8.1F: Detektion des rgp41 auf der Zelloberfläche (rote Pfeile) **D:** pTargetSeA2 8.4F: Nachweis großer Mengen permeabilisierten Proteins **E:** pTargetSe 8.2F: Nachweis von rgp41 in großen Aggregaten/ Vesikeln innerhalb der Zelle (roter Pfeil) **F:** pTargetSe 6.3F: rgp41 wurde sowohl auf der Membran, als auch innerhalb der Zellen detektiert; keine einheitliche Produktivität der Protein exprimierenden Zellen

Die Auswertung der Immunfluoreszenz der selektierten und transfizierten 293T-Zellen unter Einfluss von 5-Azacytidin zeigte in einigen Fällen die Expression des rgp41. Hierbei zeigte sich in der Expressionsleistung kein Unterschied zwischen den Klonen der 600 µg/ml G-418- und der 800 µg/ml G-418-Selektion. Alle Zellen wurden vor der Detektion durch 2F5-Antikörper mit 5-Azacytidin behandelt, um dessen Einfluss genauer zu untersuchen. Zur Analyse der Hintergrundsignale wurden zwei Kontrollen verwendet. Nur eine der beiden Negativkontrollen (Mock: nicht-transfizierte 293T-Zellen) wurde mit 5-Azacytidin behandelt. Es zeigte sich, dass die Zugabe von 5-Azacytidin keinen Einfluss auf das Wachstum nicht-transfizierter Zellen hatte. Bei der Immunfluoreszenz konnte sowohl in Vesikeln gespeichertes rgp41 innerhalb der Zellen, als auch Protein auf der Zellmembran nachgewiesen werden (Abb. 3.21), teilweise fanden sich Zellen voller Protein.

3.3 Etablierung der Zellklone in FKS-freiem Medium

Um die Schritte zur Aufreinigung des rgp41 zu vereinfachen, wurde FKS-freies Medium für die Etablierung einer permanent Protein exprimierenden Zelllinie ausgewählt.

Die Suche nach einem FKS-freien Medium begründet sich darauf, dass durch das im Medium vorliegende Albumin die Überstände exprimierender Zellen und damit das gewünschte Protein rgp41 nicht ausreichend aufkonzentriert werden konnten. Deshalb war es erforderlich, die Zellen an die neuen Bedingungen zu adaptieren. Über einen Zeitraum von drei Monaten wurden 293T-Zellen in verschiedenen Medienzusammensetzungen kultiviert und analysiert. Für die Selektion eines FKS-freien Mediums wurden verschiedenen Ausgangsmedien (Kapitel 2.2.2) verwendet.

Zu Beginn der Versuche wurden die vorhandenen Medien vielfältig kombiniert, um einen Überblick über potentielle FKS-freie Medien zur Kultivierung der 293T-Zellen zu bekommen. Hierbei zeigte sich das nur wenige der Kombinationen für eine dauerhafte Kultivierung geeignet waren. Ziel war es, eine permanent exprimierende Zelllinie in FKS-freiem Medium zu kultivieren, ohne ständige aufwendige Medienwechsel und Neutransfektionen durchzuführen. Bei der Beobachtung der Zellen konnten große morphologische Veränderungen festgestellt werden. Die sonst adhärent wachsenden Zellen bildeten Agglomerate, die teilweise schwimmend, aber auch am Wellboden haftend vorlagen (Abb. 3.22). Auch der Zusammenschluss einzelner 293T-Zellen konnte beobachtet werden. Hierbei konnte zwischen einer einzelnen bzw. einer Ansammlung mehrerer Zellen nicht mehr unterschieden werden. Auch die Anzucht der langzeitkultivierten Zellen brachte keinerlei Verbesserung. Die Lebensdauer dieser Zellen war allerdings begrenzt, so dass Möglichkeiten

der Optimierung der jeweiligen Medienkombinationen gesucht wurden. Als Zusatz fand sich schließlich Natriumpyruvat, das den Zellen im Medium mehr Energie und Widerstandsfähigkeit verleihen sollte. Um das Ablösen der Zellen vom Wellboden zu unterbinden, wurden die Wells mit einer 0,01 % Lysin (Poly L)-Lösung gespült. Die Zugabe von Poly-L begünstigte die Anheftung der nunmehr in Suspension wachsenden Zellen und Agglomerate.

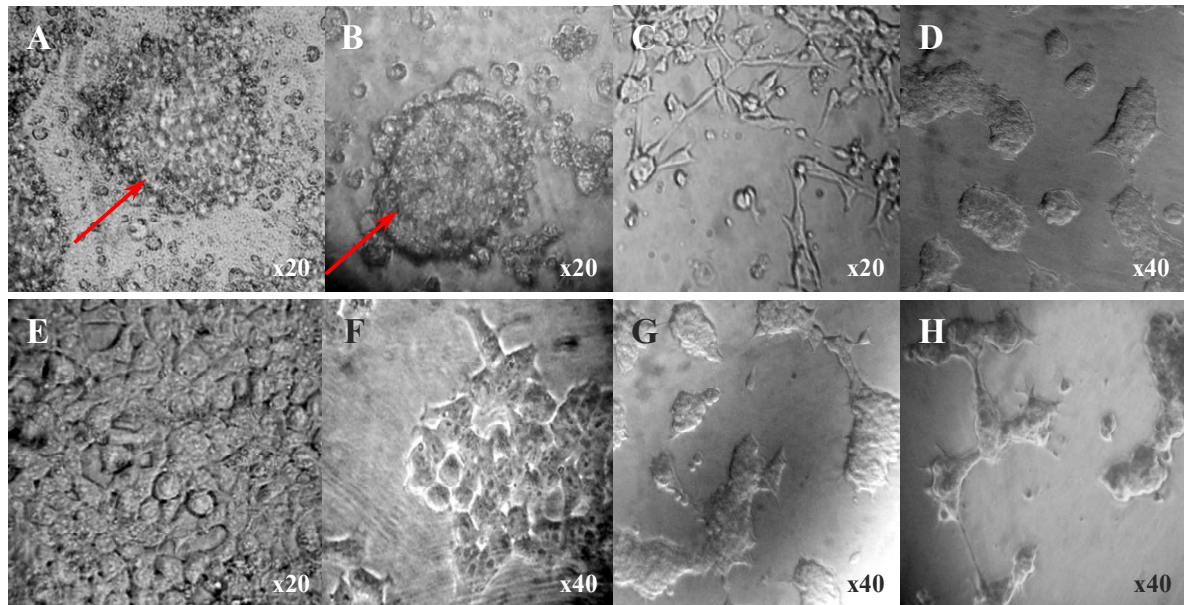


Abb. 3.22: Morphologieveränderungen als Reaktion auf die Selektion

A/B: Nach einer Inkubation von wenigen Stunden bis Tagen im Selektionsmedium zeigten sich diese Veränderungen der Zellmorphologie. Die ursprünglich flach und adhärent wachsenden 293T-Zellen bildeten nun schwimmende Agglomerate (roter Pfeil). **C:** Typisch für 293T-Zellen ist ein adhärentes Wachstum unter optimalen Bedingungen und einer Inkubation von 2 Tagen in Medium mit FKS wie hier zu sehen als Monolayer. **D:** Auch die feingliedrige Struktur der Zellen ging durch die Zugabe der ausgewählten Selektionsmedien verloren. Teilweise konnte ein Zusammenschluss einzelner Zellen beobachtet werden. **E:** 293T-Zellen unter guten Wachstumsbedingungen in einem selektierten FKS-freien Medium. Trotz fehlendem FKS ist kaum ein Unterschied zu Zellen unter normalen Medienbedingungen zu erkennen. Die Zellen benötigten lediglich mehr Zeit zum Wachsen. **F/G/H:** Durch das vorliegende Medium wurde die Wachstumsrate erheblich herabgesetzt. Diese Beobachtung ging auf Erfahrungswerte innerhalb der Projektgruppe zurück. Die Zellen wuchsen langsamer und bildeten große Zell-Agglomerate. Das Wachstum als Monolayer blieb nahe zu aus.

Letztlich zeigte die Selektion der 293T-Zellen in serumfreiem Medium nur in drei von über 40 Kombinationen der unterschiedlichen Medien ein ausreichendes Zellwachstum.

4 Diskussion

4.1 Notwendigkeit eines HIV-Impfstoffes

Trotz viel versprechender Fortschritte bei der Erforschung des humanen Immunschwächevirus steht ein präventiv oder therapeutisch wirksamer Impfstoff nach wie vor nicht zur Verfügung. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und liegen neben der hohen Variabilität vor allem in der komplexen Pathogenese der Virusinfektion begründet. Die Fähigkeit des Virus sich dem Zugriff des Immunsystems, zum Beispiel durch Integration in das Genom der Wirtszelle zu entziehen, oder die Möglichkeit einer zellgebundenen Übertragung des Virus, sowie die hohe Vermehrungsrate von HIV und die Abnahme der Zahl der CD4⁺-positiven Immunzellen sind einige der Aspekte, die die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes deutlich erschweren. Die damit verbundene Immunsuppression ist wesentlich für die im Verlauf der Erkrankung auftretenden opportunistischen Infektionen verantwortlich.

Ein anderes Problem der HIV-Infektion besteht darin, dass im Laufe der Infektion eine hohe Anzahl von Virusvarianten gebildet wird. Ausschlaggebend dafür ist die virale Reverse Transkriptase, welche die virale RNA in provirale DNA umschreibt. Dieses Enzym besitzt im Gegensatz zur DNA-Polymerase keinen *proof-reading* Mechanismus. Man geht davon aus, dass sich in einem unbehandelten infizierten Menschen 10^9 - 10^{10} Viruspartikel pro Tag bilden und es bei jedem Replikationszyklus statistisch zu einem nicht konservativen Austausch kommt (HO *et al.*, 1995). PERELSON zeigte in seinen Arbeiten, dass ein Replikationszyklus *in vivo*, d.h. von der Freisetzung von Viruspartikeln, Infektion neuer Zellen und Freisetzung einer neuen Generation von Partikeln im Durchschnitt nur 2,6 Tage beträgt (PERELSON *et al.*, 1996; PERELSON *et al.*, 1997). Dies macht deutlich, dass sich in kürzester Zeit eine Vielzahl an Varianten entwickeln kann, die das Potential haben, der aktuellen Immunantwort des Patienten zu entkommen.

4.2 Vorteile der Produktion von gp41 in humanen Zellen

Das als Antigen verwendete gp41 ist ein virales Hüllprotein. Bei der Infektion einer Wirtszelle durch das HIV und der damit einhergehenden Vervielfältigung des Virus und der Knospung neuer Viruspartikel werden auch Fragmente der Wirtsmembran als Virusmembran übernommen. Vervollständigt wird diese Membran durch virale Transmembran- und Oberflächenhüllproteine. Die Produktion des gp41 in Bakterien bewirkt Unterschiede in der Struktur und möglicherweise Funktionalität des Proteins. Ein Grund hierfür liegt in

unterschiedlichen Syntheseprozessen von pro- und eukaryotischen Zellen. Bakterien verfügen nicht über den Mechanismus posttranslationaler Modifikationen. Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen, wie humanen Zellen, sind Bakterien nicht in der Lage, Proteine durch Glykosylierungen oder Alkylierungen zu charakterisieren und diese damit vor dem Abbau durch eigene Proteasen zu schützen. Deshalb liegt die Mehrzahl der eukaryotischen Proteine in glykosylierter Form vor. Für die Funktionalität des Proteins ist die Art der Faltung und Glykosylierung aber von entscheidender Bedeutung. Bei gleichartiger Faltung eines Proteins kann Obwohl ein in Prokaryoten produziertes Protein womöglich gleichartig gefaltet ist, kann das Fehlen von Glykosylgruppen dessen Wirkung hemmen.

Um mit dem Ausgangsprotein gp41 strukturell identische rekombinante Proteine zu gewinnen, wird für die Produktion eine humane Zelllinie verwendet. Gp41 eignet sich auch deshalb gut als Zielobjekt einer Therapie, da es während der stetigen Veränderung und Mutation des Virus selbst unverändert bleibt.

4.3 Geringe Antigenmengen mit pcDNaseA2 Vektor

Für die Produktion des rgp41 als Antigen für die Immunisierung konnte mit dem ursprünglich eingesetzten Vektor pcDNaseA2 keine Transfektion aller Zellen erreicht werden. Da Zellen innerhalb einer Zelllinie nicht synchron wachsen, befinden sie sich zum Zeitpunkt der Transfektion in unterschiedlichen Wachstumsstadien. Eine erfolgreiche Aufnahme von Plasmid-DNA korreliert jedoch stark mit dem Zellstadium. Um die Expressionsleistung zu erhöhen, wurden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten der Synchronisation von Zellen beschrieben. Die Expressionsleistung nach der Transfektion mit dem Vektor pcDNaseA2 ist ohne Synchronisation der Zellen nicht hoch. Im Überstand der transfizierten Zellen sind nur geringe Mengen exprimierten rgp41 nachweisbar und das Protein musste für die Immunisierung mehrfach durch Filtration aufkonzentriert werden. Hierdurch wurden Antigenmengen von etwa 250 ng rgp41 pro Injektion und Tier gewonnen. Für die Erhebung einer statistischen Verteilung der Immunantwort der Ratten, war es nötig große Tierzahlen zu untersuchen. Für die Realisierung dessen wurden große Mengen Antigen benötigt. Trotz großen Zeitaufwandes und Materialeinsatzes war es unter Verwendung des Vektors pcDNaseA2 nicht möglich ausreichende Mengen zu produzieren.

4.3.1 Immunisierung mit geringen Dosen von rgp41

Mit dem aus der Transfektion von 293T-Zellen mit pcDNaseA2 gewonnenem Antigen wurden acht Ratten und eine Ziege immunisiert. Alle durch die Blutabnahme gewonnenen

Seren wurden im Western Blot, Epitopmapping, ELISA und Neutralisationstest untersucht. Lediglich drei von acht Ratten zeigten eine Reaktivität im Western Blot. Die immunisierte Ziege zeigte hingegen keinerlei Reaktivität in den untersuchten Verfahren. Die Reaktivität der Seren war maßgeblich durch die injizierte Menge des Antigens geprägt. In den angeführten Versuchen wurden lediglich 250 ng Antigen rgp41 pro Tier und Immunisierung injiziert. Üblicherweise werden aber bis zu 1000fach höhere Dosen (200 µg) im verwendet. Durch die geringe Antigenmenge kann auch von einer verhältnismäßig geringen Immunantwort ausgegangen werden. Überraschenderweise konnte jedoch mit geringer Dosierung des Antigens aussagekräftige Reaktionen beobachten werden. Die eingesetzte Menge Antigen zur Immunisierung richtete sich in diesem Fall nach dem Aufwand der Antigenproduktion. Für weitere Analysen und einem in größeren Mengen zur Verfügung stehenden Antigen können weitere Versuche mit höheren Dosen Antigen durchgeführt und die daraus resultierende Immunantwort analysiert werden.

In den reaktiven Seren konnten mit den Nachweisverfahren Antikörper gegen gp41 nachgewiesen werden. Da mit den getesteten Seren keine Neutralisation von HIV-1 gezeigt werden konnte, konnte davon ausgegangen werden, dass sich im Serum keine neutralisierenden Antikörper befanden.

Weiterführend sind weitere Immunisierungen mit Ratten und Ziegen geplant. Die Erhöhung der Dosierung mit der einhergehenden Verstärkung der Immunantwort wird derzeit als vielversprechende Idee verfolgt.

4.4 Expression von rgp41 durch pTargeT

Durch den Einsatz des pTargeT-Vektors sollte die Expressionsleistung und damit die Ausbeute der rgp41-Produktion gesteigert werden. Durch die Klonierung des Vektors mit zwei verschiedenen mutierten Inserts wurden zwei Expressionskonstrukte geschaffen. Beide Konstrukte pTargeTSe und pTargeTSeA2 unterschieden sich lediglich in einer Aminosäure in der Ectodomäne des gp41. Für die Transfektion der verschiedenen Expressionskonstrukte wurde neben den zwei pTargeT-Konstrukten pTargeT Se und pTargeT SeA2 auch eine Co-Transfektion mit pCLneo + pcDNase und pCLneo + pcDNaseA2 durchgeführt. Die Verwendung der Vektoren pTargeTSe und pTargeTSeA2 ermöglichte die Untersuchung des Einflusses der Punktmutation im gp41 auf dessen immunsuppressiven Eigenschaften. Für ein Peptid, das der hochkonservierten Domäne von gp41 entspricht konnte eine interspeziesreaktive Proliferationshemmung sowie die Hemmung des zytopathischen Effektes von HIV-1 auf MT4-Zellen gezeigt werden (DENNER *et al.*, 1994). Weiterhin konnte gezeigt

werden, dass gp41 *in vitro* die Expression des Interleukins IL-2 und TNF- α herunterreguliert, während die Expression der Interleukine IL-10, IL-6 und von IFN- α und IFN- γ stimuliert werden (TAKESHITA *et al.*, 1995; Denner *et al.*, 1998; BARCOVA *et al.*, 1994). Die Doppeltransfektion mit pCLneo + pcDNASE und pCLneo + pcDNASEA2 sicherte im Falle der eingeschränkten Funktionalität der pTarget-Konstrukte die Expression des Proteins in den anderen Klonen. 2 Tage nach der Transfektion konnte bei allen vier Konstrukten die Expression von rgp41 detektiert werden. Besonders auffällig war die Detektion zweier Banden in unterschiedlicher Laufhöhe. Beide Banden deuten auf die Expression des Glykoproteins rgp41 hin. Die obere, die größere Bande deutet darauf, dass das Protein innerhalb der Zelle bereits in glykosylierter Form vorliegt (Abb. 3.9). Durch die Glykosylierung vergrößert sich die Masse des Proteins und es läuft langsamer im SDS-Gel. Die kleinere Bande deutet auch auf die Expression von rgp41 hin, allerdings liegt das Protein hier noch in unglykosylierter Form in der Zelle vor. Die weitaus größere Menge an glykosyliertem Protein im Inneren der Zelle ist darauf zurückzuführen, dass die Glykosylierung ein langwieriger Prozess ist. Durch die Translation wird das rgp41 codierende Gen ständig neu gelesen, bevor dieses zum endoplasmatischen Retikulum für die Glykosylierung weitergeleitet wird. Der Prozess der Glykosylierung benötigt allerdings mehr Zeit, als die Translation selbst. Deshalb kommt es innerhalb der Zelle zu einer Anhäufung und Aufkonzentrierung des Proteins, bevor es von der Zelle endgültig nach außen geschleusst werden kann (release) (REHM *et al.*, 2009).

Durch die anschließende Überführung der transfizierten Zellen in Selektionsmedium mit Geneticin, sollte eine Selektion der exprimierenden von den nicht-exprimierenden Zellen erreicht werden. Da aus den bereits genannten Gründen eine hundertprozentige Transfektion ohne vorherige Behandlung der Zellen nicht zu realisieren war, sollte die Selektion durch das Antibiotikum Geneticin (G-418) erreicht werden. Alle Konstrukte trugen das Gen für eine Geneticinresistenz.

4.4.1 Transfektion und Methylierung

Nach der Analyse präparierter Zelllysate über einen Zeitraum von mehreren Wochen der im Selektionsmedium kultivierten transfizierten Zellen, zeigte sich ein Rückgang der Expression des rgp41 bereits nach 7 Tagen nach Selektionsbeginn. Grund für den Rückgang der Expression kann der steigende Selektionsdruck durch das im Medium vorliegende G-418 auf die transfizierten Zellen sein. Durch die Selektion wäre es möglich, dass es zum Auswurf der eingebrachten Konstrukte kommt. In diesem Fall würde es zum sofortigen Zelltod kommen,

da die Zelle nun über keinerlei Resistenzgen mehr verfügt. Demzufolge ist es wahrscheinlicher, dass die Sequenz des Neo^r-Gens des rgp41 noch in der Zelle, entweder als Plasmid oder als bereits integrierter Teil der genomischen DNA vorliegt. Sie verleiht damit der Zelle eine Resistenz und sichert deren Überleben im Selektionsmedium. Ein möglicher Grund für die eingeschränkte bzw. völlig inhibierte Expression nach 7 Tagen unter Einfluss von G-418 könnte u.a. die Methylierung der viralen DNA, vor allem des Promotors sein. Da die Zelle unter den gegebenen Bedingungen lediglich auf die Resistenz gegenüber G-418 angewiesen war, kann es zur bewussten Abschaltung der zu exprimierenden gp41 Sequenz oder dessen Promotors gekommen sein. Warum es aber womöglich nur zur Methylierung der gp41 Sequenz und nicht des Resistenzgens gekommen war, konnte hier nicht eindeutig beantwortet werden. Um das zu überprüfen, wurden verschiedene Verfahren zur quantitativen Bestimmung der viralen DNA beispielsweise die PCR oder die Real Time-PCR genutzt.

4.4.2 Detektion viralen Genoms in selektierten Klonen

Die Menge der durch die Real Time-PCR-Analyse detektierten viralen DNA lässt Schlussfolgerungen auf das mögliche Expressionsverhalten der jeweiligen Zelle zu. Eine große Menge viraler DNA lässt darauf schlussfolgern, dass die Expression des rgp41 theoretisch möglich sein muss, lediglich durch andere Faktoren unterbunden sein kann. Bei den getesteten Klonen konnte lediglich in 20 von 60 Fällen virale DNA in größeren Mengen detektiert werden. Die Angabe des CT-Wertes (*cycle threshold*) gibt hierbei Auskunft darüber wie viel virale DNA in den getesteten Klonen detektiert wurde. Ein kleiner CT-Wert deutet auf große Mengen viralen Genoms und steht demnach antiproportional zur nachgewiesenen DNA-Menge. Für die weitere Untersuchung wurden die Klone mit den geringsten CT-Werten verwendet. In den verbliebenen Klonen konnte zwar virale DNA nachgewiesen werden, ob es sich hierbei allerdings um stark exprimierende Klone handelt, wurde nicht weiter untersucht.

4.4.3 Methylierung unterbindet Antigenexpression in einer Zelllinie

Zur Überprüfung einer Methylierung der codierenden Sequenz wurde wie von GÖTZINGER *et al.* (1996) das Reagenz 5-Azacytidin verwendet. Bei 5-Azacytidin und n-Butyrat handelt es sich um zwei Reagenzien, die die Expression von Genen in eukaryotischen Zellen selektiv aktivieren können (FU *et al.*, 2010). Neben der Aktivierung kann es bei der Verwendung zu hoher Dosierungen allerdings auch zur Hemmung der Proteinsynthese der Zelle, wie auch der Apoptose (induzierter Zelltod) der Zellen kommen. Nach Angaben von GÖTZINGER *et al.* (1996) reichen 10 µM 5-Azacytidin in Zellkulturmedium gelöst aus, um die Methylierung

bzw. Demethylierung zumindest bei Retroviren zu steuern. Entgegen der Veröffentlichung von GÖTZINGER wurden nach Vorversuchen mit 1,0 mg/ 50 ml 5-Azacytidin lediglich 0,1 mg/ 50 ml 5-Azacytidin (2 µg/ml) in Zellkulturmedium (DMEM) gelöst und für einen kürzeren Zeitabschnitt auf die Zellen aufgebracht. Um Beeinträchtigungen der selektierten Klone zu vermeiden wurden die Zellen lediglich 42 Stunden bei 0,1 mg 5-Azacytidin in Zellkulturmedium (DMEM) und in regelmäßigen Abständen, alle 24 Stunden, erneuert, da die Langzeitstabilität des 5-Azacytidine nicht garantiert werden konnte. Bereits die ersten, nach 2 Tagen Inkubation präparierten Zelllysate, zeigten eine eindeutig gesteigerte Expressionsleistung des gp41 der Klone.

4.4.4 Kultivierung selektierter Klone in FKS-freiem Medium

Um die Aufreinigung des in Zellkultur produzierten Antigens rgp41 zu vereinfachen, sollte eine Zelllinie in FKS-freiem Medium etabliert werden. Dass durch das im Medium vorliegende Albumin die Überstände exprimierender Zellen und damit das sezernierte Protein rgp41 nicht ausreichend aufkonzentriert werden können. Das Albumin blockiert bei jeder Art der Zentrifugation oder Aufkonzentrierung die Poren einer Selektionsmembran und ist auf keinem anderen Weg aus dem Medium zu entfernen. FKS ist für die Zellen ein wachstumsrelevanter Faktor, der, falls nicht vorhanden, die Lebensbedingungen der Zellen einschränkt. Die FKS-freien Medien enthalten u.a. Natriumpyruvat und garantieren dadurch gute Wachstumsmöglichkeiten auch bei fehlendem FKS.

4.4.5 Einfluss der Expression von gp41 auf die Zellmorphologie

Bei der Selektion der gp41 exprimierenden Zellen für die Zelllinie über einen Zeitraum von mehreren Monaten wurden erhebliche morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet. Die ursprünglich adhärent wachsenden Zellen lösten sich teilweise vom Wellboden ab und bildeten große Zellzusammenschlüsse. Diese Agglomerate wuchsen in Suspension weiter. Da ein Absterben der Zellen nur zu Beginn zu beobachten war und die Agglomerate über einen langen Zeitraum konstant im Selektionsmedium wuchsen, war anzunehmen, dass sich innerhalb dieser Zellverbände ein eigenes Mikroklima bildete, das das Wachstum im selektiven Medium ermöglichte.

5 Zusammenfassung

Breit neutralisierende Antikörper, die gegen die membranproximale externe Region (MPER) des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV gerichtet sind, wurden von HIV-1-Infizierten isoliert. Um derartige breit neutralisierende Antikörper zu gewinnen, wurden hier Immunisierungsstudien mit rekombinantem gp41 durchgeführt. Im ersten Teil der Arbeit wurden Ratten mit einem in einer humanen Zelllinie produzierten rekombinanten transmembranen Hüllprotein gp41 immunisiert. Die Analyse des Antigens zeigte, dass es glykolysiert ist. Es wurden bindende Antikörper gegen gp41 nachgewiesen, die jedoch nicht neutralisierten. Allerdings konnte bei einem Epitopmapping der getesteten Seren unter Verwendung überlappender Peptide ein Epitop im MPER des gp41 identifiziert werden, das auch vom breit neutralisierenden Antikörper 2F5 erkannt wird. Um gp41 in größeren Mengen herzustellen, wurden im zweiten Teil der Arbeit humane 293T-Zellen mit vier verschiedenen Expressionsvektoren transfiziert, die die Expression von gp41 und die Selektion von Geneticin-resistenten Zelllinien erlaubten. Das produzierte gp41 war in der immunsuppressiven Domäne mutiert und konnte bei Inkubation mit PBMC's von Blutspendern im Unterschied zum nicht mutierten gp41 kein IL-10 mehr induzieren. Bei der Selektion der Zelllinie zeigte sich, dass die Expression von gp41 durch Methylierung der Gensequenz gehemmt wurde. Die Methylierung konnte jedoch unter Verwendung von 5-Azacytidin aufgehoben werden. Um die Aufreinigung des produzierten gp41 zu erleichtern, wurden die Zelllinien in FKS-freiem Medium kultiviert. Drei Zelllinien wurden etabliert, die in FKS-freiem Medium gp41 in den Überstand sezernieren, das nunmehr für Immunisierungszwecke genutzt werden kann.

Literaturverzeichnis

ALTFELD M., Goulder P.: Unleashed natural killers hinder HIV; *Nat Genet*; 39(6): 708-10; **2007**

AMEISEN J.C.; Capron A.: Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis; *Immunol.Today*; 12: 102-105; **1991**

BABA T.W., Jeong Y.S., Pennick D., Bronson R., Greene M.F., Ruprecht R.M.: Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques; *Science*; 267: 1820-1825; **1995**

BABA T.W., Liska V., Khimani A.H., Ray N.B., Dailey P.J., Penninck D., Bronson R., Greene M.F., McClure H.M., Martin L.N., Ruprecht R.M.: Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques [see comments]; *Nat.Med.*; 5: 194-203; **1999**

BALL J.M., Hardy M.E., Atmar R.L., Conner M.E., Estes M.K.: Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice; *J. Virol.*; 72: 1345-1353; **1998**

BALLAS Z.K., Rasmussen W.L., Krieg A.M.: Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA; *J. Immunol.*; 157: 1840-1845; **1996**

BARCOVA M., La Cava A., Carbone E., Moscarella A., Salzano S., Zappacosta S., Fontana S.: A novel strategy of c-myc oncogene in NK activity regulation not related to the W6/32 MHC class-I epitope; *Int J Cancer*; 58 (1): 123-8; **1994**

BARRÉ-SINOUSSE F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L.: Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS); *Science*; 220: 868-871; **1983**

BERGER E.A., Murphy P.M., Farber J.M.: Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease; *Annu Rev Immunol*; 17: 657-700; **1999**

BMZ - Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung: BMZ Materialien 177 – Gesundheit fördern – HIV/AIDS bekämpfen; Stand: **2007**
URL: www.bmz.de/de/service/infothek/fach/materialien/Materialie177.pdf
Verfügbar am 13.07.2010

BJORKMAN P.J., Saper M.A., Samaraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C.: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens; *Nature*; 329: 512-8; **1987**

BOLOGNESI D.P.: AIDS. Do antibodies enhance the infection of cells by HIV? [news]; *Nature*; 340: 431-432; **1989**

BUCHBINDER S.P., Mehrotra D.V., Duerr A., Fitzgerald D.W., Mogg R., Li D., Gilbert P.B., Lama J.R., Marmor M., del Rio C., McElrath J.M., Casimiro D.R., Gottesdiener K.M., Chodakewitz J.A., Corey L., Robertson M.N.: Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (The Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial; *Lancet*; 372: 1881-1893; **2008**

BUCHSCHACHER G.L. Jr, Wong-Staal F.: Approaches to gene therapy for human immunodeficiency virus infection; *Hum Gene Ther*; 12(9): 1013-9 (Review); **2001**

BUGE S.L., Murty L., Arora K., Kalyanaraman V.S., Markham P.D., Richardson E.S., Aldrich K., Patterson L.J., Miller C.J., Cheng S.M., Robert Guroff M.: Factors associated with slow disease progression in macaques immunized with an adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) envelope priming-gp120 boosting regimen and challenged vaginally with SIVmac251; *J. Virol.*; 73: 7430-7440; **1999**

BUGE S.L., Richardson E., Alipanah S., Markham P., Cheng S., Kalyan N., Miller C.J., Lubeck M., Udem S., Eldridge J., Robert-Guroff M.: An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge; *J.Virol.*; 71: 8531-8541; **1997**

CAO J., Bergeron L., Helseth E., Thali M., Repke H., Sodroski J.: Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein; *J Virol*; 67:2747-55; **1993**

CHAN D.C., Fass D., Berger J.M., Kim P.S.: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein; *Cell*; 89:263-73; **1997**

CHAN D.C., Kim P.S.: HIV Entry and its inhibition; *Cell*; 93:681-4; **1998**

CHUN T.W., Stuyver L., Mizell S.B., Ehler L.A., Mican J.A., Baseler M., Lloyd A.L., Nowak M.A., Fauci A.S.: Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 94: 13193-13197; **1997**

CLERICI M., Shearer G.M.: A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection; *Immunol.Today*; 14: 107-111; **1993**

COHEN J.: AIDS vaccine research. A new goal: preventing disease, not infection [news]; *Science*; 262: 1820-1821; **1993**

COSTIN J.M.: Cytopathic mechanisms OF HIV-1; *Virol J.*; 4: 100 (Review); **2007**

DANIEL M.D., Kirchhoff F., Czajak S.C., Sehgal P.K., Desrosiers R.C.: Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene; *Science*; 258: 1938-1941; **1992**

DAVIES J., Jimenes A.: A new selective agent for eukaryotic cloning vectors; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; Bd. 29: 1089-1092; **1980**

DELTA: A randomized double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals; *Lancet*; 348:283-91; **1996**

DELWART E.L., Mosialos G., Gilmore T.: Retroviral envelope glycoproteins contain a leucine zipper-like repeat; *AIDS Res Hum Retroviruses*; 6:703-6; **1990**

DEMKOWICZ W.E., Littaua R.A., Wang J.M., Ennis F.A.: Human cytotoxic T-cell memory-Long-Lived responses to vaccinia virus; *J.Virol.*; 70: 2627-2631; **1996**

DENNER J., Norley S., Kurth R.: the immunosuppressive peptide oh HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients; *AIDS*; 8(8):1063-72; **1994**

DENNER J., Persin C., Vogel T., Haustein D., Norley S., Kurth R.: The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T- and B-lymphocyte stimulation; *J. AIDS and Human Retrovirology*; 12: 442-450; **1996**

DENNER J.: Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation; *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; 862: 75-86; **1998**

DENNER J.: Mikrobiologische Risiken der Xenotransplantation. In: Neue Perspektiven der Transplantationsmedizin im interdisziplinären Dialog, Ed. E.-M. Engels, G. Badura-Lotter, S. Schicktanz, *Nomos Verlagsgesellschaft*, Baden- Baden, 142 – 169; **2000**

DENNER J.: How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis; *J Hum Virol*; 3: 81-82; **2000**

DENNER J.: Endogenous retroviruses In: Kurth R., Bannert N. (eds.): *Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis*, Caister Academic Press, Hethersett, Norwich; 35-69; **2010**

DOMS R.W.: Chemokine receptors and HIV entry; *AIDS*; Suppl 1: S34-5; **2001**

DULBECCO R.: Francis Payton Rous 1879-1970 - A Biographical Memoir; *National Academy of Science*, Washington D.C., **1976**

EARL P.L., Sugiura W., Montefiori D.C., Broder C.C., Lee S.A., Wild C., Lifson J., Moss B.: Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp140; *J. Virol.*; 75: 645-653; **2001**

ECKERT D.M., Kim P.S.: Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition; *Annu Rev Biochem*; 70:777-810; **2001**

EZEKOWITZ R.A.B.: Innate Immunity; *Curr Op Immunol*; 10: 9 - 53; **1998**

FARZAN M., Choe H., Desjardins E., Sun Y., Kuhn J., Cao J., Archambault D., Kolchinsky P., Koch M., Wyatt R., Sodroski J.: Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain; *J.Virol.*; 72: 7620-7625; **1998**

FIEBIG U., Stephan O., Kurth R., Denner J.: Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses (PERVs): Basis for a vaccine for xenotransplantation?; *Virology*; 307(2): 406-413; **2003**

FIEBIG U., Langhammer S., Kurth R., Denner J.: Induction of HIV-neutralising antibodies of the 2F5/4E10 type; *Retrovirology*; 2(Suppl I): S71; **2005**

FIEBIG U., Hartmann M.G., Bannert N., Kurth R., Denner J.: Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus (KoRV); *J. Virol.*; 80 (11): 5651-5654; **2006**

FIEBIG U., Schmolke M., Eschricht M., Kurth R., Denner J.: Mode of interaction between the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5 and its epitope; *AIDS*; 23(8): 887-895; **2009**

FREED E.O.: HIV-1 replication; *Somat Cell Mol Genet*; 26(1-6): 13-33 (Review); **2001**

FU S., Hu W., Iyer R., Kavanagh J.J., Coleman R.L., Levenback C.F., Sood A.K., Wolf J.K., Gershenson D.M., Markman M., Hennessy B.T., Kurzrock R., Bast R.C.Jr.: Phase 1b-2a study to reverse platinum resistance through use of a hypomethylating agent, azacitidine, in patients with platinum-resistant or platinum-refractory epithelial ovarian cancer; *Cancer*; Epub ahead of print; **2010**

FULLER D.H., Haynes J.R.: A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 10: 1433-1441; **1994**

FYNAN E.F., Webster R.G., Fuller D.H., Haynes J.R., Santoro J.C., Robinson H.L.: DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 90: 11478-11482; **1993**

GALLAHER W.R., Ball J.M., Garry R.F., Griffin M.C., Montelaro R.C.: A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses; *AIDS Res Hum Retroviruses*; 5(4):431-40; **1989**

GANTER S., Sauermost R.: Herder-Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie; *Spektrum Akademischer Verlag*; 1944 Seiten; **1995**

GILBERT P.B., Peterson M.L., Follmann D., Hudgens M.G., Francis D.P., Gurwith M., Heyward W.L., Jobes D.V., Popovic V., Self S.G., Sinangil F., Burke D., Berman P.W.: Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial; *J Infect Dis*;191(5):666-77; **2005**

GOTTLIEB M.S., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A., Saxon A.: *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency; *New England Journal of Medicine*; 305: 1425 - 1431; **1981**

GULICK R.M.: New antiretroviral drugs; *Clin Microbiol Infect*; 9(3): 186-93 (Review); **2003**

GÖTZINGER N., Sauter M., Roemer K., Mueller-Lantzsch N.: Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours; *J. Gen Virol.*; 77 (Pt 12): 2983-90; **1996**

HADFIELD C., Jordan B.E., Mount R.C., Pretorius G.H., Burak E.: G418-resistance as a dominant marker and reporter of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*; *Curr. Genet.*; 18(4): 303-13; **1990**

HAHN H., Adler K., Schad D., Ulrich T.: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; *Springer Medizin Verlag*; Ausgabe 6; 890 Seiten; Heidelberg; **2008**

HAMILTON J.D., Hartigan P.M., Simberkoff M.S., Day P.L., Diamond G.R., Dickinson G.M., Drusano G.L., Egorin M.J., George W.L., Gordin F.M., *et al.*: A controlled trial of early versus late treatment with zidovudine in symptomatic HIV infection; *N Engl J Med*; 326:437-43; **1992**

HAMMER S.M., Katzenstein D.A., Hughes M.D., Gundacker H., Schooley R.T., Haybrich R.H., Henry W.K., Lederman M.M., Phair J.P., Niu M., *et al.*: A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter; *N Engl J Med*; 335:1081-90; **1996**

HARRIS S.J., Gearing A.J., Layton G.T., Adams S.E., Kingsman A.J.: Enhanced proliferative cellular responses to HIV-1 V3 peptide and gp120 following immunization with V3:Ty virus-like particles; *Immunology*; 77: 315-321; **1992**

HELSETH E., Olshevsky U., Furman C., Sodroski J.: Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein; *J Virol*; 65:2119-23; **1991**

HENGGE U.R., Walker P.S., Vogel J.C.: Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin; *J. Clin. Invest.*; 97: 2911-2916; **1996**

HERBECK J.T., Gottlieb G.S., Li X., Hu Z., Detels R., Phair J., Rinaldo C., Jacobson L.P., Margolick J.B., Mullins J.I., Tripathy S.: Lack of Evidence for Changing Virulence of HIV-1 in North America; *PLoS ONE*; 3(2), e1525; **2008**

HILLER K., Lindequist U., Melzig M.F.: Lexikon der Biochemie in zwei Teilen; Spektrum Akademischer Verlag/ Elsevier GmbH; 1. Auflage; 473 Seiten; Pohlheim; **2000**

HO D.D., Neumann A.U., Perelson A.S., Chen W., Leonard J.M., Markowitz M.: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection; *Nature*; 373: 123-126; **1995**

HOFFMANN C.: ART 2004, HIVNET 2004.; *Steinhäuser Verlag*; Wuppertal, **2004**

IFI - INSTITUT FÜR INTERDISZIPLINÄRE MEDIZIN: Verlauf einer HIV-Infektion; URL: www.ifi-medizin.de/BaseCMP/pages/contentdelivery?CID=5325&JOB_NAME=DISPLAY_PAGE; Verfügbar am 13.07.**2010**

IGFM - INTERNATIONALE GESELLSCHAFT FÜR MENSCHENRECHTE: Allgemeine Erklärung der Menschenrechte; URL: www.igfm.de/Allgemeine-Erklaerung-der-Menschenrechte.89.0.html Verfügbar am 11.08.**2010**

IMBERTI L., Sottini A., Bettinardi A., Puoti M., Primi D.: Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V beta sequences; *Science*; 254: 860-862; **1991**

IVANOWSKI Lecoq. H.: Discovery of the first virus, the tobacco mosaic virus: 1892 or 1898?; *C R Acad Sci III*; 324(10): 929-33; **1892**

KAHN M.A.: A review and update on HIV infection and the AIDS epidemic in the adolescent and adult; *J. Tenn. Dent. Assoc.*; 80: 21-27; **2000**

KLINMAN D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., Conover J., Krieg A.M.: CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma; *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*; 93: 2879-2883; **1996**

KNIPPERS R.: Molekulare Genetik; *Georg Thieme Verlag*; Ausgabe 9: 567 Seiten; **2006**

KRÄNKEL H.V.: Vermehrung; URL: www.hvkraenkel.de/images/Hiv_gross_german.png; Verfügbar am 03.03. **2010**

KRIEG A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation; *Nature*; 374: 546-549; **1995**

KWONG P.D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R.W., Sodroski J., Hendrickson W.A.: Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody; *Nature*; 393:648-59; **1998**

LANGHAMMER S., Fiebig U., Kurth R., Denner J.: Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV); *Vaccine*; 23: 3341-3348; **2005a**

LANGHAMMER S., Hübner J., Kurth R., Denner J.: Antibodies neutralising feline leukemia virus (FeLV) in cats immunised with the transmembrane envelope protein p15E; *Immunology*; 117: 229-237; **2005b**

LANGHAMMER S., Fiebig U., Hübner J., Kurth R., Denner J.: Increased neutralizing antibody response after simultaneous immunization with Leucogen and the feline leukemia virus transmembrane protein; *Intervirology*; 54: 78-86; **2010**

LAYTON G.T., Harris S.J., Gearing A.J., Hill Perkins M., Cole J.S., Griffiths J.C., Burns N.R., Kingsman A.J., Adams S.E.: Induction of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo with hybrid HIV-1 V3: Ty-virus-like particles; *J. Immunol.*; 151: 1097-1107; **1993**

LEONARD C.K., Spellman M.W., Riddle L., Harris R.J., Thomas J.N., Gregory T.J.: Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells; *J Biol Chem*; 265:10373-82; **1990**

LEVINE A.M., Groshen S., Allen J., Munson K.M., Carlo D.J., Daigle A.E., Ferre F., Jensen F.C., Richieri S.P., Trauger R.J., Parker J.W., Salk P.L., Salk J.: Initial studies on active immunization of HIV-infected subjects using a gp120-depleted HIV-1 Immunogen: long-term follow-up; *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.Hum.Retrovirol.*; 11: 351-364; **1996**

LEVY J.A.: Features of human immunodeficiency virus infection and disease; *Pediatr. Res.*; 33: S63-S69; **1993**

LIU J.: Average 3D structure of the trimeric glycoprotein spike on native HIV-1; *Nature*; 1-5; **2008**

LODE H.: Globalisierte resistente Erreger und neue Impfstoffe. *Chemotherapie Journal*; 9. Jahrgang; 04/2000; Berlin; **2000**

LU S., Santoro J.C., Fuller D.H., Haynes J.R., Robinson H.L.: Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice; *Virology*; 209: 147-154; **1995**

LUBECK M.D., Natuk R.J., Chengalvala M., Chanda P.K., Murthy K.K., Murthy S., Mizutani S., Lee S.G., Wade M.S., Bhat B.M.: Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration [published erratum appears in *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995 Jan; 11(1):189]; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 10: 1443-1449; **1994**

MAGGI E., Mazzetti M., Ravina A., Annunziato F., De Carli M., Piccinni M.P., Manetti R., Carbonari M., Pesce A.M., Del Prete G.: Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells; *Science*; 265: 244-248; **1994**

MARCUS U., Dittmar M.T., Kräusslich H.G.: HIV: Epidemiology and strategies for therapy and vaccination; *Intervirology*; 45:260-6; **2002**

MARTINELLI C., Reichhart J.M.: Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions; *J Endotoxin Res*; 11(4): 243-248; **2005**

MASCOLA J R., Snyder S.W., Weislow O.S., Belay S.M., Belshe R.B., Schwartz D.H., Clements M.L., Dolin R., Graham B.S., Gorse G.J., Keefer M.C., McElrath M.J., Walker M.C., Wagner K.F., McNeil J.G., McCutchan F.E., Burke D.S.: Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group; *J. Infect. Dis.*; 173: 340-348; **1996**

MCELRATH M.J., De Rosa S.C., Moodie Z., Dubey S., Kierstead L., Janes H., Defawe O.D., Carter D.K., Hural J., Akondy R., Buchbinder S.P., Robertson M.N., Mehrotra D.V., Self S.G., Corey L., Shiver J.W., Casimiro D.R.: HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis; *Lancet*; 372 (9653): 1894-1905; **2008**

METCHNIKOFF E.: Immunity in infectious diseases; New York: Macmillan Press; 1.Auflage; **1995**

MICHEL M.L., Mancini M., Riviere Y., Dormont D., Tiollais P.: T- and B-lymphocyte responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in macaques immunized with hybrid HIV/hepatitis B surface antigen particles; *J.Virol.*; 64: 2452-2455; **1990**

MILICH D.R., McLachlan A., Chisari F.V., Kent S.B., Thorton G.B.: Immune response to the pre-S(1) region of the hepatitis B surface antigen (HBsAg): a pre-S(1)-specific T cell response can bypass nonresponsiveness to the pre-S(2) and S regions of HbsAg; *J.Immunol.*; 137: 315-322; **1986**

- MILICH D.R.**, Thornton G.B., Neurath A.R., Kent S.B., Michel M.L., Tiollais P., Chisari F.V.: Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen; *Science*; 228: 1195-1199; **1985**
- MOCROFT A.**, Katlama C., Johnson A.M., Pradier C., Antunes F., Mulcahy F., Chiesi A., Phillips A.N., Kirk O., Lundgren J.D.: AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study; *Lancet*; 356:291-6; **2000**
- MOORE J.H.**, Thornton T.A., Ritchie M.D.: Basic statistics; *Curr Protoc Hum Genet*; Appendix 3: Appendix 3M (Review); **2003**
- MOSS B.**, Smith G.L., Gerin J.L., Purcell R.H.: Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B; *Nature*; 311: 67-69; **1984**
- NAHMIAS A.J.**, Weiss J., Yao X., Lee F., Kodosi R., Schanfield M., Matthews T., Bolognesi D., Durack D., Motulsky A., Kanki P., Essex M.: Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa; *The Lancet*; 1279 - 1280; **1959**
- NEKHAI S.**, Jeang K.T.: Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev; *Future Microbiol*; 1:417-26 (Review); **2006**
- NEUMANN A.U.**, Tubiana R., Calvez V., Robert C., Li T.S., Agut H., Autran B., Katlama C.: HIV-1 rebound during interruption of highly active antiretroviral therapy has no deleterious effect on reinitiated treatment. Comet Study Group.; *AIDS*; 13: 677-683; **1999**
- PALKER T.J.**, Matthews T.J., Langlois A., Tanner M.E., Martin M.E., Searce R.M., Kim J.E., Berzofsky J.A., Bolognesi D.P., Haynes B.F.: Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes; *J.Immunol.*; 142: 3612-3619; **1989**
- PAOLETTI E.**, Lipinskas B.R., Samsonoff C., Mercer S., Panicali D.: Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D; *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*; 81: 193-197; **1984**
- PERELSON A.S.**, Essunger P., Ho D.D.: Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo; *AIDS*; 11 Suppl A: S17-S24; **1997**
- PERELSON A.S.**, Neumann A.U., Markowitz M., Leonard J.M., Ho D.D.: HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time; *Science*; 271: 1582-1586; **1996**
- PICARD O.**, Lebas J., Imbert J.C., Bigel P., Zagury D.: Complication of intramuscular/subcutaneous immune therapy in severely immune-compromised individuals; *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*; 4: 641-643; **1991**
- RAMIREZ J.C.**, Gherardi M.M., Esteban M.: Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation; *J.Virol.*; 74: 923-933; **2000**

REDFIELD R.R., Wright D.C., James W.D., Jones T.S., Brown C., Burke D.S.: Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease; *N. Engl. J. Med.*; 316: 673-676; **1987**

REHM H., Letzel T.: Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics; *Springer Verlag*; 390 Seiten; **2009**

REKKS-NGARM S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., Kaewkungwal J., Chiu J., Paris R., Premisri N., Namwat C., de Souza M., Adams E., Benenson M., Gurunathan S., Tartaglia J., McNeil J.G., Francis D.P., Stablein D., Birx D.L., Chunsuttiwat S., Khamboonruang C., Thongcharoen P., Robb M.L., Michael N.L., Kunasol P., Kim J.H.: Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand; *N. Engl. J. Med.*; 361: 2209–2220; **2009**

RIA F., Chan B.M., Scherer M.T., Smith J.A., Geffer M.L.: Immunological activity of covalently linked T-cell epitopes; *Nature*; 343: 381-383; **1990**

RICHERI S.P., Bartholomew R., Aloia R.C., Savary J., Gore R., Holt J., Ferre F., Musil R., Tian H.R., Trauger R., Lowry P., Jensen F., Carlo D.J., Maigetter R.Z., Prior C.P.: Characterization of highly purified, inactivated HIV-1 particles isolated by anion exchange chromatography; *Vaccine*; 16: 119-129; **1998**

RINALDO C., Huang X.L., Fan Z.F., Ding M., Beltz L., Logar A., Panicali D., Mazzara G., Liebmann J., Cottrill M.: High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors; *J. Virol.*; 69: 5838-5842; **1995**

RKI - ROBERT KOCH-INSTITUT: Epidemiologisches Bulletin - HIV-Infektionen/ AIDS Jahresbericht 2009; Nr. 22; **2010**

SAAG M.S.; Kilby J.M.: HIV-1 and HAART: a time to cure, a time to kill [news; comment]; *Nat. Med.*; 5: 609-611; **1999**

SATO Y., Roman M., Tighe H., Lee D., Corr M., Nguyen M.D., Silverman G.J., Lotz M., Carson D.A., Raz E.: Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization; *Science*; 273: 352-354; **1996**

SCHIRMBECK R., Melber K., Mertens T., Reimann J.: Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis; *J. Virol.*; 68: 1418-1425; **1994**

SCHLIENGER K., Mancini M., Riviere Y., Dormont D., Tiollais P., Michel M.L.: Human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates; *J. Virol.*; 66: 2570-2576; **1992**

SCHULZE U., **HARTMANN M.**: Bioinformatik - Praktikum: Konservierte RNA-Strukturen/ Retrovirusklassen; Universität Leipzig; **2004**

URL: www.bioinf.uni-leipzig.de/Leere/PRAKTIKUM/Protokolle/WS03/2/einfuehrung.html
Verfügbar am: 17. März 2010

- SHEIN H. M., Enders J. F.:** Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures - Morphology and growth characteristics; *PNAS*; 48:1164-72; **1962**
- SMAGLIK P.:** Bacterial AIDS vaccine ready for testing; *Nature*; 405: 386; **2000**
- SMITH G.L.,** Mackett M., Moss B.: Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen; *Nature*; 302: 490-495; **1983**
- STACEY K.J.,** Sweet M.J., Hume D.A.: Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA; *J. Immunol.*; 157: 2116-2122; **1996**
- TACKE S.,** Kurth R., Denner, J.: Porcine endogenous retrovirus inhibits human immune cells: Risk for xenotransplantation; *Virology*; 268: 87-93; **2000**
- TAN K., Liu J., Wang J., Lu M.:** Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94:12303-8; **1997**
- TANG D.C.,** DeVit M., Johnston S.A.: Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response; *Nature*; 356: 152-154; **1992**
- TIBOTEC;** www.tibotec.com; Verfügbar am 18.07.**2010**
- TRIPATHY S.P.,** Kumar A., Manivel V., Panda S.K., Rao K.V.: Design and synthesis of a self-assembling peptide derived from the envelope proteins of HIV type 1. An approach to heterovalent immunogens; *J. Immunol.*; 148: 4012-4020; **1992**
- TUNG F.Y.,** Rinaldo C.R.Jr., Montelaro R.C.: Replication-defective HIV as a vaccine candidate. *AIDS; Res.Hum.Retroviruses*; 14: 1247-1252; **1998**
- ULMER J.B.,** Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dwarki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., DeWitt C.M., Friedman A.: Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein [see comments]; *Science*; 259: 1745-1749; **1993**
- UNAIDS** - United Nations AIDS Organisation; URL: www.unaids.org/en/CountryResponses/default.asp; verfügbar am 13.07.**2010**
- VAN REGENMORTEL M.H.,** Mayo M.A., Fauquet C.M., Maniloff J.: Virus nomenclature: consensus versus chaos; *Arch Virol*; 145(10):2227-32; **2000**
- VELIN D.,** Hopkins S., Kraehenbuhl J.: Delivery systems and adjuvants for vaccination against HIV; *Pathobiology*; 66: 170-175; **1998**
- WANG B.,** Boyer J., Srikantan V., Coney L., Carrano R., Phan C., Merva M., Dang K., Agadjanian M., Gilbert L.: DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates; *DNA Cell Biol.*; 12: 799-805; **1993**
- WEBER J.:** The pathogenesis of HIV-1 infection; *Br Med Bull*; 58:61-72; **2001**
- WEISS R.A.:** The discovery of endogenous retroviruses; *Retrovirology*; 3:67; **2006**

WEISSENHORN W., Dessen A., Harrison S.C., Skehel J.J., Wiley D.C.: Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41; *Nature*; 387:426–30; **1997**

WELCH B.D., VanDenmark A.P., Heroux A., Hill C.P., Kay M.S.: Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry; *Proc Natl Acad Sci USA*; 104(43): 16828-33; **2007**

WHO - Worl Health Organisation; URL: www.who.int/en/; verfügbar am: 13.07.2010

WIKTOR T.J., Macfarlan R.I., Reagan K.J., Dietzschold B., Curtis P.J., Wunner W.H., Kieny M.P., Lathe R., Lecocq J.P., Mackett M.: Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 81: 7194-7198; **1984**

WIKTOR T.J., Macfarlan R.I., Reagan K.J., Dietzschold B., Curtis P.J., Wunner W.H., Kieny M.P., Lathe R., Lecocq J.P., Mackett M.: Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene: 1984 [classical article]; *Biotechnology*; 24: 508-512; **1992**

WOLFF J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L.: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo; *Science*; 247: 1465-1468; **1990**

WOLFF J.A., Williams P., Acsadi G., Jiao S., Jani A., Chong W.: Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo; *Biotechniques*; 11: 474-485; **1991**

WYATT R., Kwong P.D., Desjardins E., Sweet R.W., Robinson J., Hendrickson W.A., Sodroski J.: The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein; *Nature*; 393:705-11; **1993**

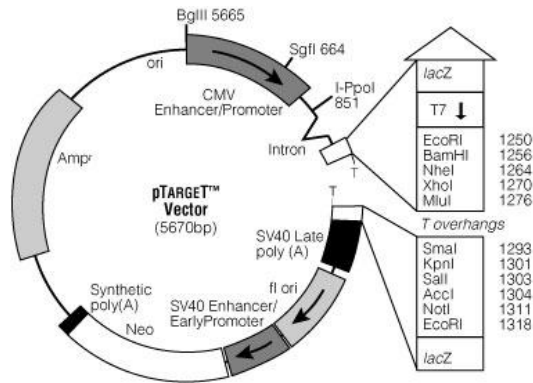
WYATT R., Sodroski J.G.: The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens; *Science*; 280:1884-8; **1998**

ZAITSEVA M., Peden K., Golding H.: HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors; *Biochim Biophys Acta*; 1614(1): 51-61; **2003**

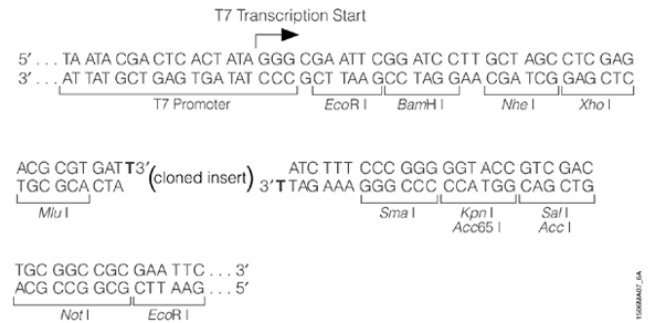
ZUR HAUSEN H.: Induction of specific chromosomal aberrations by Adenovirus Typ 12 in human embryonic kidney cells; *Journal of Retrovirology*; 1 (6): 1174 – 85; **1967**

ANHANG

Vektorkarte *pTarget*



Multiple Cloning Region des pTarget-Vektors:



Vektorkarte *pcDNA3.1*

